

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**FACTORES GENÉTICOS Y
AMBIENTALES MODIFICADORES DE LA
TOXICIDAD POR AMILOIDE EN UN
MODELO MURINO DE ENFERMEDAD
DE ALZHEIMER**

Juan Perucho González

Madrid, 2011

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

FACTORES GENÉTICOS Y AMBIENTALES MODIFICADORES DE LA TOXICIDAD POR AMILOIDE EN UN MODELO MURINO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Memoria de la Tesis para optar al grado de doctor presentada por el
licenciado en CC Biológicas:

Juan Perucho González

Directores de la Tesis:

Dra. María Ángeles Mena Gómez

Servicio de Neurobiología-Investigación
Hospital Universitario Ramón y Cajal

Dr. Justo García de Yébenes Proust

Servicio de Neurología
Hospital Universitario Ramón y Cajal



HOSPITAL RAMON Y CAJAL
Unidad de Neurofarmacología
Servicio de Neurobiología
Departamento de Investigación

Carretera de Colmenar, Km 9.1
28034 Madrid, Spain
Tfno: +34-91-336-8384
Fax: +34-91-336-9016

Los Drs. M^a Ángeles Mena y Justo García de Yébenes, facultativos de los servicios de Neurobiología-Investigación y Neurología del Hospital Universitario Ramón y Cajal, como directores del trabajo de investigación de la tesis doctoral: "Factores genéticos y ambientales modificadores de la toxicidad por amiloide en un modelo murino de enfermedad de Alzheimer" realizada en la unidad de Neurofarmacología del servicio de Neurobiología-Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

CERTIFICAN:

Que este estudio experimental llevado a cabo por Juan Perucho González es satisfactorio y apto para ser presentado como Tesis Doctoral en el Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Dra. M A Mena
e-mail: maria.a.mena@hrc.es

Dr. Justo García de Yébenes
e-mail: jgyebenes@yahoo.es

Este trabajo ha sido realizado en el en la unidad de Neurofarmacología del servicio de Neurobiología-Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal gracias a un contrato pre-doctoral concedido por el CIBER de enfermedades neurodegenerativas (CIBERNED), y a los apoyos económicos de los proyectos: CAM 2006/0202, FIS 2007/37, FIS 2010/172, Laín Entralgo NDG07/4, CIBERNED 2006/05/0059 y PI 2010/06.

Dedicado como siempre y como nunca:
a mi madre, Maria Isabel y a mi abuela, "Mamagrande"

AGRADECIMIENTOS

Lo primero agradecer a M Ángeles y Justo por darme la oportunidad. Especialmente a M Ángeles por guiarme y enseñarme todo el camino. De verdad, muchas gracias por permitirme hacer lo que siempre quise: trabajar aprendiendo cosas nuevas todos los días y "rebuscar" allí donde no sé.

Muchas gracias a mis compañeros durante este tiempo, por enseñarme, aguantarme, entenderme y apoyarme no solo en problemas científicos sino personales, de decoración, emocionales y lo que hiciera falta. Ha sido genial todo este tiempo, siempre quise investigar y además siento que he tenido una enorme suerte con mis compañeros de viaje. Muchísimas gracias Mari Jose, Rosa, Mari Paz, Jose, Izaskun, Laura, Carol, Paty... a todos gracias por vuestro tiempo, trabajo y paciencia, os lo debo todo a vosotros que tiráis de esto día a día.

En los sótanos... que paso mas tiempo que en casa: gracias M. Jose y Rosita por ser mi "madres" en el laboratorio, por desesperarse y cuidarse de mi, por vuestra naturalidad, por solo tener gestos cariñosos y una mano tendida siempre, gracias por hacerme sentir bien desde el primer día. Ya me parece conocer a Álvaro y Gonzalo como si fueran primos; Rosita, que hemos vivido contigo el embarazo (los primeros sonidos que oyó la pobre serían probetas y resoplidos de ese verano!), nacimiento y pasar de bebe a niña de Paula, cuéntaselo para que ya no me tema disfrazado de verde!. Nada de eso se olvida, muchas gracias.

Anita, te mereces una estatua por tu trabajo y lo que me aguantas, como no se hacer estatuas, ni cantar (tu tampoco aunque te empeñes), solo puedo darte mil gracias mil veces, no hay mejor compañera. Currante a mas no poder, tranquila y cabezona casi en la misma proporción, amiga con mayúsculas, confidente, resolutive, divertida y la mejor persona que te puedas encontrar. No se decir cuántos datos has sacado, cuántas gráficas son tuyas, cuantas tardes hasta las mil... tenemos mucha suerte contigo, muchas gracias. Aunque no quieras me debes un tour por tu pueblo, que sin conocerlo ya le tengo cariño por tu culpa. Mamá, Ana es lo que me "encuentra las células" cuando las pierdo, a ver que hago yo en el labo sin ella, cuando no te vea a diario lo echaré de menos Anita.

Gracias a todos los por vuestro trabajo, ayuda y crear un ambiente tan genial en el labo: Mati ("la ministra"), Laura (nuestra princesa cubana), un recuerdo enorme allá donde vayáis. Desde la 7 derecha, gracias Izaskun por las histologías y el buen humor, que nunca deja impasible. Paty, gracias por ser siempre una sonrisa amable, Isabel por tu forma de ser (un beso enorme Isa!). Carol, suerte en tus experimentos, gracias por ser atenta con todos, ánimo que después vas tú. Josué, gracias por enseñarme "hilando" y animarme, por ser la palmada en el hombro (variando de intensidad según circunstancia), gracias por enseñarme el camino

andando delante. Un beso grande para Nata y Claudia, ojala andaraís mas cerca, ¿os imagináis visitando juntos parques y columpios?. Seria divertido teneros cerca.

A los del Banco de Tejidos un recuerdo, Isra, Jose Ramón sois los frikis que quiero ser cuando sea mayor, me habría encantado trabajar con vosotros. Cuidadme a Raquel, que se que os tiene dominados, pero seguro gasta mucha paciencia con vosotros. Raquel será divertido verles perder dignidad delante de un nen@ que viene.

En el pasillo y alrededores: muchas gracias Toni por introducirme en los primeros pasos en este mundo de la ciencia, también gracias por la oportunidad y tiempo que me diste. Gracias a Rafa, compañero de fatigas, al que conozco desde mas tiempo de mis compañeros, por todas las horas de labo al principio y las mejores de amistad que siguen, te vas a jorobar y sabrás de mi, por listo ;). A ver si acabas y la lees, que no quería ir yo primero!. Irene ánimo!, que no puede seer tan malo (glup). Jose y Jose carlos, por representar la testosterona mas pura y compensar, gracias por las risas y las propuestas de cañas que hacen falta (Jose Carlos tira ese jersey). A M. José Asensio, a "Lili", a Lali, a Carlos Paino, a Cris y Maka, mis ex-compis de labo, por ser la sonrisa desde las 8 am y alegrarnos a los demás, gracias a todos por dejar lo que hacéis para ayudar siempre que se os pide, sois geniales, mil gracias.

Muchas gracias por vuestro trabajo, vuestra dedicación, vuestra paciencia, comprensión. Es evidente, pero hay que decirlo: este trabajo es NUESTRO, de todos, porque no habría sido posible sin tod@s vosotr@s, muchísimas gracias, de todo corazón. Una nieta nueva (M Ángeles, Justo), dos primos lejanos ya criados (M Joe), una niña nueva (Paula) y otra por venir (Josué y cols. jeje), un "proyecto" en marcha (Raquel) y uno propio (Marcos). Lo mires por donde lo mires hasta en esto ha sido unos años productivos!!

A mi hermano Alfredo por cuidarse de todos nosotros, indicarme dónde y abrirme la puerta, y al resto de mis hermanos, sobrinos y familia en general por contribuir todo lo que no es ciencia en la vida: Gracias.

A Gema, por aportar y representar todo lo bueno que faltaba en mi vida (Marcos y tú). Gracias por tu paciencia y comprensión sin límites, y por ser como eres, que suerte tengo.

Y a mi madre porque allí donde llegue siempre será gracias a ti, eres la persona que más admiro, muchísimas gracias mamá, por ser referencia y el pilar de todo y todos. Como creo que lo digo poco, hoy lo escribo: Te quiero y muchas gracias mamá.

ÍNDICE

ÍNDICE	Página 1
I- RESUMEN	9
II- INTRODUCCIÓN	15
I. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	17
1.1. La enfermedad de Alzheimer	19
1.1.1 El β -amiloide, las placas neuríticas y la enfermedad de Alzheimer	21
1.1.2 La proteína tau en la enfermedad de Alzheimer	25
1.1.3 Activación microglial y neuroinflamación en Alzheimer	26
1.1.4 Factores genéticos de enfermedad de Alzheimer	27
1.1.5 El género, ¿modificador del riesgo de enfermedad de Alzheimer?	28
1.1.6 Modelos de enfermedad de Alzheimer	29
1.2.1 La enfermedad de Parkinson	30
1.2.2 Factores genéticos en la enfermedad de Parkinson	32
1.2.3 La proteína parkina, ¿factor modificante de la toxicidad por amiloide?	34
1.2.3.1 Parkina como E3 ubiquitin ligasa	36
1.2.3.2 Modelos de eliminación genética de la parkina en ratones	39
II. LA ANESTESIA ¿FACTOR EXTERNO MODIFICADOR DE LA TOXICIDAD EN ENFERMEDAD DE ALZHEIMER?	41
2.1.1 La anestesia	42
2.1.2 Empirismo en la anestesia	43
2.1.2.1 Concentración Alveolar Mínima (CAM)	44
2.1.3 La anestesia y la enfermedad de Alzheimer	45
2.1.3.1 Efectos de anestésicos en cultivos neuronales	47
2.1.3.2 Efecto de anestésicos en experimentos <i>in vivo</i>	47
2.1.3.3 Características del isoflurano	49
2.1.3.4 ¿La anestesia factor neurotóxico?	50
2.1.3.5 La anestesia y su influencia en la proteína tau	51

III. LA TREHALOSA COMO FACTOR NEUROPROTECTOR DE LA TOXICIDAD POR ANESTESIA EN UN MODELO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	52
3.1 La trehalosa	53
3.1.1 Papel de la trehalosa como bioprotector	53
3.2 La autofagia	55
3.2.1 La autofagia como tratamiento frente a proteinopatías	56
3.3 La trehalosa como compuesto neuroprotector en proteinopatías	57
III- OBJETIVOS	59
IV- MATERIAL Y MÉTODOS	63
MATERIALES Y REACTIVOS	
Anticuerpos	65
Reactivos para Western Blot	66
Reactivos para inmunohistoquímica	66
Reactivos de Biología Molecular	67
Otros reactivos	68
1. ANIMALES UTILIZADOS	
1.1 Obtención y cruce	69
a) Anestesia crónica y aguda	69
b) Supresión de Parkina en APP _{swe}	70
1.2 Genotipado de ratones	72
a) Genotipado	72
b) PCR cuantitativa a tiempo real	74
2. PROCESO ANESTÉSICO	
2.1 Anestesia crónica	75
2.2 Anestesia aguda	75
2.3 Estudio de variables respiratorias y cardiovasculares durante la anestesia	76
a) Electrocardiograma	76
b) Monitorización de variables cardiovasculares	77
3. ESTUDIOS DE CONDUCTA	
3.1 Actividad motora	77

3.2 Laberinto en Y	78
3.3 Rota-rod	79
3.4 Estudio de zancada	80
4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDO CEREBRAL	81
5. ANÁLISIS HISTOLÓGICO	82
5.1 Hematoxilina / eosina e inmunohistoquímica	82
5.2 TUNEL	82
5.3 Estudio de gliosis: astrositos	83
6. ENSAYOS BIOQUÍMICOS	
6.1 Concentraciones de proteínas	83
6.2 Electroforesis, transferencia e inmunodetección de proteínas	84
6.3 ELISA para la cuantificación de fracción soluble y total de β -amiloide	85
6.4 Agregación y caracterización del péptido A β (1-42)	85
6.5 Medición de la actividad proteosomal	86
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	86
V- RESULTADOS	87
I. ANULACIÓN PARCIAL Y TOTAL DE LA PROTEÍNA PARKINA EN UN MODELO GENÉTICO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	89
1.1 Actividad motora, de exploración, supervivencia y fenotipo clínico en ratones APP _{swe} y APP _{swe} /PK	90
1.2 Producción y acumulación de β -amiloide en ratones APP _{swe} y APP _{swe} /PK	93
1.3 Muerte celular por apoptosis en ratones APP _{swe} y APP _{swe} /PK	97
1.4 Estudio de gliosis en ratones APP _{swe} y APP _{swe} /PK	98
1.5 Acumulación de tau total y fosforilada en ratones APP _{swe} y APP _{swe} /PK	100
1.6 Niveles de chaperonas	102
1.7 Marcadores de autofagia	102
1.8 Actividad del proteosoma en ratones APP _{swe} y APP _{swe} /PK+/-	103
ANEXO I	
Resultados hembras de 12 meses: WT, APP _{swe} , APP _{swe} /PK+/-,	105

PK+/-

II. TRATAMIENTO CRÓNICO CON ISOFLURANO EN UN MODELO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	108
2.1 Supervivencia y comportamiento	109
2.2 Marcadores de muerte y apoptosis en hipocampo	111
2.3 Efecto de la anestesia en células gliales	112
2.4 Acumulación de proteína tau y aumento de amiloide.	114
Marcadores de patología Alzheimer	114
2.5 Efecto del isoflurano sobre la expresión de chaperonas y autofagia	116
III. TRATAMIENTO AGUDO CON ISOFLURANO Y NEUROPROTECCIÓN CON TREHALOSA EN UN MODELO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	119
3.1 Administración de trehalosa e índice mnemónico durante el tratamiento con isoflurano	120
3.2 La trehalosa reduce la apoptosis inducida por tratamiento agudo con isoflurano	121
3.3 Gliosis en APP _{swe} tras exposición aguda a isoflurano y reversión por tratamiento con trehalosa	123
3.4 Chaperona HSP70 y co-chaperona CHIP en isoflurano agudo y tratamiento con trehalosa	125
3.5 Marcadores de autofagia en tratamiento agudo con isoflurano y pretratamiento con trehalosa	126
3.6 Efecto del tratamiento con isoflurano agudo y trehalosa en la acumulación de β -amiloide	127
3.7 Resultado de la patología tau tras la exposición aguda a isoflurano y tratamiento con trehalosa	129
VI- DISCUSIÓN	131
I. ANULACIÓN PARCIAL Y TOTAL DE PARKINA EN UN MODELO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	134
<i>Anulación parcial de la parkina en APP_{swe}</i>	135
<i>Anulación total de la parkina</i>	135

<i>La parkina y la amiloidogénesis</i>	137
<i>Muerte celular y patología tau</i>	138
<i>La gliosis y la influencia de la parkina en la patología Alzheimer</i>	140
<i>Mecanismos de compensación ante la deficiencia de parkina</i>	142
 II. LA ANESTESIA CON ISOFLURANO AUMENTA LA PATOLOGÍA AMILOIDE EN UN MODELO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	146
<i>La anestesia y la enfermedad de Alzheimer, evidencia clínica</i>	146
<i>Estudios in vitro entre Aβ y la anestesia</i>	147
<i>La enfermedad de Alzheimer y los anestésicos in vivo</i>	149
 III. LA TREHALOSA COMO PROTECCIÓN DE LA PATOLOGÍA AMILOIDE INDUCIDA POR ISOFLURANO EN UN MODELO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	153
<i>Un modelo de anestesia aguda</i>	154
<i>La trehalosa y neuroprotección en un modelo de enfermedad de Alzheimer y anestesia aguda</i>	156
 VII- CONCLUSIONES	161
 VIII- BIBLIOGRAFÍA	165
 IV- ANEXO	191
 Publicaciones en los que ha participado durante la tesis doctoral	193
Comunicaciones a congresos	205

I- RESUMEN

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una demencia degenerativa que se caracteriza por deterioro progresivo de memoria y otros trastornos cognitivos y que puede considerarse como la enfermedad neurodegenerativa más prevalente. Con la inversión de la pirámide poblacional la prevalencia e impacto socio-sanitario de la EA aumentarán exponencialmente.

Desde el punto de vista clínico la EA presenta trastornos cognitivos de carácter progresivo que pueden similar a otros de carácter transitorio que se observan en cuadros confusionales atribuibles a procesos metabólicos o tóxicos. Entre estos estados transitorios de alteración cognitiva hay que incluir al deterioro cognitivo post operatorio (post operative cognitive dysfunction, POCD, en ingles), observada en pacientes mayores sometidos a anestesia, la amnesia global transitoria y otros. El estudio de estos fenómenos de carácter reversible puede ser útil para investigar los mecanismos de inicio y eventualmente los factores de reversibilidad de la EA.

La EA se caracteriza por la agregación y el depósito anormal de una serie de proteínas, entre las que destaca el péptido β -amiloide y la proteína tau. Este fenómeno ocurre también en otras enfermedades neurodegenerativas que se suelen identificar por el depósito de una proteína hiperagregada, que predomina en una determinada estructura cerebral. Así, por ejemplo, se produce agregación de tau o de ubiquitina en las demencias fronto-temporales; de α -sinucleína en la enfermedad de Parkinson (EP) y en la demencia por cuerpos de Lewy; de huntingtina en la enfermedad de Huntington.

Las enfermedades neurodegenerativas se producen por una combinación de factores genéticos y ambientales, y ambos tipos de factores pueden considerarse modificadores recíprocos de la patología. Existen numerosas interacciones entre las distintas proteínas implicadas, de manera que se ha descubierto, que los polimorfismos genéticos de una proteína pueden ser moduladores del fenotipo en enfermedades caracterizadas por patología de otra proteína diferente.

Una proteína especialmente interesante en la neurodegeneración es la parkina, cuyo déficit es responsable de EP familiar autosómico recesivo y de

origen temprano en todo el mundo. Además de jugar un papel en la patogénesis de la EP, la parkina puede jugar un papel modulador de otras enfermedades neurodegenerativas, puesto que es una ubiquitina-ligasa que puede contribuir a la eliminación de proteínas anormales a través del sistema ubiquitin proteosoma. La parkina actúa como una ubiquitina-ligasa, estabiliza los microtúbulos e interacciona con otras proteínas, como actina y tau.

Nosotros hemos investigado la interacción entre parkina, involucrada en la EP, y el péptido β -amiloide, característico de la EA. Hemos descubierto que, al contrario de lo esperado, los ratones dobles mutantes para la proteína precursora del amiloide y nulos para la parkina ($APP_{swe}/PK^{-/-}$) muestran una mejoría de la patología amiloide, y que este efecto beneficioso de la supresión de parkina, se debe a la compensación del defecto de función de la vía ubiquitina proteosomal por otros sistemas de eliminación de proteínas. Este sistema podría ser útil para estudiar la posibilidad de paliar los efectos tóxicos en la EA mediante la potenciación de sistemas de compensación como la autofagia, las chaperonas moleculares y la homeostasis del glutatión (GSH).

El efecto de los factores ambientales sobre la EA puede investigarse en el laboratorio mediante intervenciones como la anestesia que producen en sujetos humanos fenómenos como el POCD. Nosotros hemos demostrado que los anestésicos volátiles de pequeño peso molecular empeoran la conducta, la muerte neuronal y el depósito de péptido β -amiloide en ratones transgénicos con mutaciones que en humanos se asocian a EA. La anestesia con isoflurano, tanto crónica como aguda, agrava la patología amiloide en los ratones APP_{swe} pero no en ratones controles. La trehalosa, un disacárido con propiedades de protección proteica e inductora de autofagia, protege del efecto tóxico debido al isoflurano en ratones modelo de EA.

Los factores genéticos, como la supresión de parkina, que activan mecanismos compensatorios de eliminación de proteínas, o la activación farmacológica de estos mecanismos, como el tratamiento con trehalosa, disminuyen la patología amiloide en ratones transgénicos y podrían hacerlo en humanos. La selección de anestésicos no amiloidogénicos en individuos con riesgo genético de EA cuando sea posible, o la prevención de los posibles

efectos secundarios, con estimuladores de la autofagia, como la trehalosa, podría disminuir el riesgo de EA.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a degenerative dementia characterized by progressive deterioration of memory and other cognitive disorders and can be regarded as the most prevalent neurodegenerative disease. With the inversion of the population pyramid the prevalence and health impact of AD will increase exponentially. From the clinical point of view AD presents a progressive cognitive disorder that may be similar to other transitional disorders due to metabolic or toxic processes. Among these transitory states of cognitive impairment the Post-operative Cognitive Dysfunction (POCD) must be included, has been observed in elderly patients undergoing anesthesia and transient global amnesias. The study of these reversible phenomena may be useful to investigate the mechanisms of AD initiation and eventually find reversibility factors of AD. AD is characterized by abnormal aggregation of proteins, among the most important are β -amyloid peptide and tau protein. This phenomenon occurs in other neurodegenerative diseases, that are often identified by the hyperaggregation of a protein, which predominates in a particular brain structure. For example there is aggregation of tau or ubiquitin in frontotemporal dementias; α -synuclein in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies and huntingtin in Huntington's disease.

Neurodegenerative diseases are caused by a combination of genetic and environmental factors, and both types should be considered as modifiers of the pathology. There are many interactions between proteins involved in such a way that genetic polymorphisms of a protein may be modulating the phenotype in diseases characterized by the pathology of a different protein. A particularly interesting protein in neurodegeneration is parkin, which deficit is responsible for early familial PD. Besides playing a role in the pathogenesis of PD, parkin acts as a modulator in other neurodegenerative diseases, is an ubiquitin-ligase that can contribute to the elimination of abnormal proteins through the ubiquitin

proteasome system (UPS). Parkin acts not only as an ubiquitin ligase, stabilize microtubules and interacts with other proteins such as actin and tau.

We have investigated the interaction between parkin, involved in PD, and β -amyloid peptide, characteristic of AD. We found that, contrary to our expectations, the double mutant mice for the amyloid precursor protein and null for Parkin ($APP_{swe}/PK^{-/-}$) show an improvement in amyloid pathology, and that this beneficial effect of removing parkin is due to the compensation of the UPS by other protein removal systems. This system could be useful to study the possibility of mitigate the toxic effects in AD through enhancement of compensation systems as autophagy, molecular chaperones and homeostasis of glutathione (GSH).

The effect of environmental factors in the EA can be investigated in the lab through interventions such as anesthesia, trying to reproduce phenomena like POCD. We have shown that volatile small molecular weight anesthetics worsen behavior, neuronal death and β -amyloid peptide deposition in transgenic mice with mutations associated with AD. Anesthesia with isoflurane, both chronic and acute, exacerbate amyloid pathology in APP_{swe} mice but not in WT mice. Trehalose, a disaccharide with protein protective properties and an autophagy inducer, protects against toxic effects due to isoflurane in mice models of AD.

Genetic factors, such as parkin deletion, which enhances compensatory mechanisms that activate protein removal or pharmacological activation of these mechanisms, as with trehalose treatment, decrease amyloid pathology in transgenic mice and may do so in humans. The selection of not amyloidogenic anesthetics in individuals at genetic risk of AD, and the prevention of potential side effects stimulating autophagy, such as trehalose does, may reduce the risk of AD.

II- INTRODUCCIÓN

I. La enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson

El concepto de las enfermedades neurodegenerativas se origina a finales del siglo XIX y hace referencia a procesos no atribuibles a factores externos (trauma, infección, inflamación, tumor, etc.), que tienen un inicio en la edad adulta o senil y que suelen afectar de forma predominante a determinados y específicos sistemas neuronales.

La acumulación de proteínas alteradas y la formación de oligómeros tóxicos, parece ser un punto común en algunas de las enfermedades neurodegenerativas más importantes, como ocurre en la enfermedad de Alzheimer (EA) y Parkinson (EP) (Forloni y cols., 2002). La pérdida de las sinapsis y la patología axonal son algunos de los mecanismos considerados como responsables de las demencias. Además en algunos estudios, se sugiere que también podrían contribuir las alteraciones en la neurogénesis del cerebro adulto (Haughey y cols., 2002; Donovan y cols., 2006). La posibilidad de la existencia de mecanismos comunes, y cuáles coexisten en este camino es objeto de numerosos estudios en la actualidad, con resultados variables. Algunos estudios excluyen la agregación de proteínas u oligómeros como el punto esencial, y es considerado un estadio final de la enfermedad (Forloni y cols., 2002), mientras que una postura más "clásica" sigue apuntando como mecanismo disparador la toxicidad de los productos intermedios (monómeros, dímeros, fibrillas y fibras) (Walsh y cols., 2002; Oddo y cols., 2004; Hung y cols., 2008; Lord y cols., 2009) de la "cascada de agregación del amiloide", por ejemplo en la EA (Hardy, 2002; Pastor y cols., 2007; Simon y cols., 2010; Tampellini y Gouras, 2010).

Se ha propuesto que la agregación de diferentes acúmulos proteicos impide el correcto funcionamiento del principal sistema de degradación de proteínas: el proteosoma previo marcaje mediante ubiquitina, UPS (Ubiquitin Proteasome System). Esta acumulación produciría una retroalimentación positiva: al no funcionar correctamente este sistema se acumularían aún más las proteínas y esto aumentaría en última instancia la toxicidad celular (Bence y cols., 2001).

La EA se caracteriza por la acumulación de ovillos neurofibrilares de proteína tau, placas de proteína amiloide, disfunción del citoesqueleto y depósitos del péptido A β en los vasos sanguíneos del cerebro (Glenner y Wong, 1984; Glenner y cols., 1984; Grundke-Iqbal y cols., 1986a; Grundke-Iqbal y cols., 1986b; Gaig y cols., 2006). La proteína mejor estudiada en la EA es el péptido A β . Su conformación nativa es de α -hélice, pero se desestabiliza con facilidad hacia estructuras β formándose los depósitos insolubles agregados en el cerebro (Almeida y cols., 2006; Han y cols., 2008; Oddo y cols., 2008). En la mayoría de los casos la EA tiene un origen esporádico pero un porcentaje pequeño de casos son atribuibles a mutaciones del gen de la proteína precursora del amiloide (APP) y de dos proteínas, la presenilinas 1 y 2 (PSEN-1 y PSEN-2) que intervienen en el procesamiento del APP y en la formación del péptido A β .

La EP se caracteriza desde el punto de vista clínico por acinesia, rigidez, temblor, trastornos posturales y otros déficits neurológicos y por una degeneración progresiva de las células dopaminérgicas de la sustancia nigra y la formación de depósitos proteicos característicos, los cuerpos de Lewy, formados sobre todo por α -sinucleína (Li y cols., 2004). La EP tiene en la mayor parte de los casos un carácter esporádico pero en casi una cuarta parte de los casos es atribuible a mutaciones de un número de genes cada vez mayor, que a finales de 2010 alcanzaba el número de 16 (Bekris y cols., 2010). Entre estos genes patogénicos el gen Park-2, responsable del mayor número de casos hereditarios de EP, codifica una de las proteínas implicadas en la EP, la parkina. Las mutaciones de Park-2 producen con frecuencia Parkinson de tipo juvenil, y, a veces, EP indistinguible del esporádico. El papel que desempeña parkin en este proceso se considera ligado a su actividad como "ubiquitin ligasa", es decir como una enzima de unión de ubiquitina a los sustratos y proteínas a degradar vía UPS (Zhang y cols., 2000; Cookson, 2005).

La EP y la EA pueden compartir más elementos comunes de lo que habitualmente se reconoce. Dos elementos que apoyan esta conclusión son:

- 1) La mayoría de los pacientes con EP de larga evolución presentan aspectos de deterioro cognitivo, a veces similares a los que se observan en sujetos con EA.
- 2) La mayoría de los sujetos con demencia de inicio tardío, > de 70 años, presentan hallazgos neuropatológicos típicos de demencias mixtas en los que los elementos patológicos de enfermedad de Alzheimer se mezclan con cuerpos de Lewy y con lesiones vasculares.

Nuestro objetivo ha sido estudiar en ratones transgénicos con mutaciones del gen APP el impacto de la supresión de la función de parkina, con la intención de estudiar posibles efectos de demencia y parkinsonismo, el de agentes anestésicos que pueden jugar un papel patógeno sobre aspectos cognitivos y el de la estimulación de factores de autofagia sobre el procesamiento de estas proteínas.

1.1 La enfermedad de Alzheimer

Los síntomas de la enfermedad de Alzheimer como una entidad nosológica fueron identificados por Emil Kraepelin (Dahm, 2006) aunque la neuropatología característica fue observada por primera vez por Alois Alzheimer en 1906 (Alzheimer y cols., 1991). Se considera el “descubrimiento” como obra de ambos neuropatólogos, sin embargo, dada la gran importancia que Kraepelin daba a encontrar la base neuropatológica de los desórdenes psiquiátricos, decidió nombrar la enfermedad en honor a su compañero. La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad de evolución lenta y se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria del paciente, la orientación, el juicio y el lenguaje. Su duración desde el diagnóstico es variable pero oscila de 8 a 12 años, con una etapa inicial sutil en patología, lo que hace que a su diagnóstico y tratamiento se llegue con la enfermedad avanzada (Morelli L, 2008). Es la enfermedad de mayor impacto socio-económico del mundo “desarrollado” y la primera enfermedad neurodegenerativa en número de afectados (Brookmeyer y cols., 2007). El envejecimiento de la población, así como el aumento de la esperanza de vida, dispara cada año los gastos de tratamiento, representando un alto porcentaje de los gastos sanitarios (Meek y

cols., 1998; Wimo y cols., 2003; Bonin-Guillaume y cols., 2005). La causa de la EA es desconocida en la mayor parte de los pacientes, pero se considera que el riesgo de aparición está influida por factores tanto genéticos como ambientales (Stozicka y cols., 2007; Vasto y cols., 2007; Vasto y cols., 2008; Zawia y cols., 2009). Entre los factores de riesgo ambientales "probados" repetidamente a lo largo de los estudios realizados, se encuentran el envejecimiento, los factores de riesgo vasculares (hipertensión, diabetes, hipercolesterolemia, obesidad, etc.), la exposición a cirugía y anestesia, la soledad, el aislamiento, la privación sensorial y otros. Entre los factores de riesgo genéticos destacan las mutaciones de APP, PSEN-1 y PSEN-2, el síndrome de Down (la trisomía del cromosoma 21, aumenta la dosis de la proteína precursora amiloide), la presencia de uno o más alelos ApoE4 y una serie de marcadores genéticos pendientes de confirmar recientemente identificados en análisis extensivos del genoma humano (GWAS).

La EA tiene dos etiologías: esporádica (95% de los casos) y familiar (hereditaria). Se caracteriza por una neurodegeneración progresiva, sobre todo en córtex e hipocampo, zonas relacionadas con la memoria e integración. Además de la muerte selectiva de estas neuronas se produce la formación de placas de proteína β -amiloide (en principio extraneuronales), y ovillos neurofibrilares de proteína tau (intraneuronales), necesarios para la confirmación postmórtem del diagnóstico de EA (Glennner y Wong, 1984; Grundke-Iqbal y cols., 1986b). También existe déficit de neurotransmisores en el cerebro, y se considera que la sintomatología de demencia se debe a estos trastornos. Las neuronas que sintetizan y liberan la acetilcolina sufren una degeneración grave durante el curso de la enfermedad. La concentración y la actividad de enzimas de síntesis, colina acetiltransferasa (CAT) como de degradación, acetilcolinesterasa (ACE) se reducen en la corteza límbica y cerebral, también se producen pérdidas de cuerpos celulares colinérgicos en el sistema septo-hipocámpal, y el sistema colinérgico basal anterior, núcleo basal de Meynert (Selkoe, 2001).

La EA no afecta las capacidades de la memoria de la misma forma. La memoria a largo plazo o memorias episódicas, así como la memoria semántica o de los hechos aprendidos y la memoria implícita, que es la llamada "memoria

corporal" sobre cómo realizar las acciones, se afectan en menor grado que las capacidades para aprender nuevos hechos o el crear nuevas memorias (Carlesimo y Oscar-Berman, 1992; Jelicic y cols., 1995). En el inicio de su desarrollo se producen lapsos de memoria en las etapas iniciales y dificultades comunicativas (anomia), en reconocimiento de las percepciones (agnosia) y dificultades en ejecución de movimientos (apraxia). Además de la ya conocida pérdida de memoria, en ocasiones se acompaña de problemas de lenguaje caracterizándose, principalmente, por una reducción del vocabulario y una disminución en la fluidez de las palabras. También torpeza al realizar tareas motoras finas, tales como escribir, dibujar o vestirse y ciertas dificultades de coordinación y de planificación (Benke, 1993). Se considera que el paciente mantiene una relativa autonomía hasta la dependencia total al final de la enfermedad.

1.1.1 El β -amiloide, las placas neuríticas y la enfermedad de Alzheimer

Las placas neuríticas son focos microscópicos de depósitos del péptido β -amiloide asociado con daño neuronal y neurítico, sobre todo en la corteza, preferentemente en las zonas límbica y de asociación (Dickson y cols., 1997). La presencia de estas lesiones, junto con los acúmulos de la proteína tau (confirmadas postmortem) y su extensión son necesarios para el diagnóstico de EA definitiva (Figura 1).

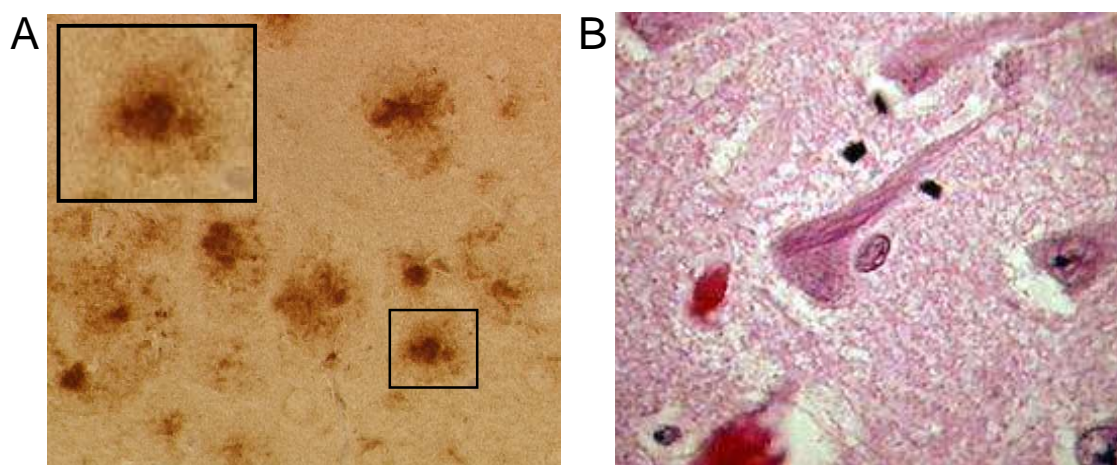


Figura 1. (A) Ejemplos de placas neuríticas de β -amiloide (detalle de placa aumentada), marcadas con anticuerpo anti-A β (1-42) y (B) ovillo de la proteína tau con hematoxilina/eosina. Ambas imágenes tomadas en corteza de ratón modelo APP/PS1 de enfermedad de Alzheimer (imagen obtenida de www6.ufrgs.br, universidad de Rio Grande).

Las placas de β -amiloide son el estadio final de un proceso de oligomerización progresivo de fragmentos de la proteína APP. La proteína APP es una glicoproteína de membrana con un largo dominio NH₂ terminal, una región transmembrana y un extremo c-terminal localizado en el citoplasma C-terminal. Contiene 18 exones, con el péptido A β localizado entre los exones 16 y 17 (Lemaire y cols., 1989). Diferentes transcritos se obtienen del splicing de esta región, pero solo unas determinadas formas contienen el péptido en sí y por tanto son potencialmente amiloidogénicos. En la hipótesis de la "cascada de amiloidosis" se postula que la EA no se produce como consecuencia de una pérdida de función de la APP, sino por la producción o acumulación del producto A β y su toxicidad (Figura 2). Esta acumulación acaba produciendo la disfunción sináptica y la muerte neuronal que produce la patología observada en EA (Walsh y cols., 2002; Kaye y cols., 2003; Hung y cols., 2008; Lord y cols., 2009).

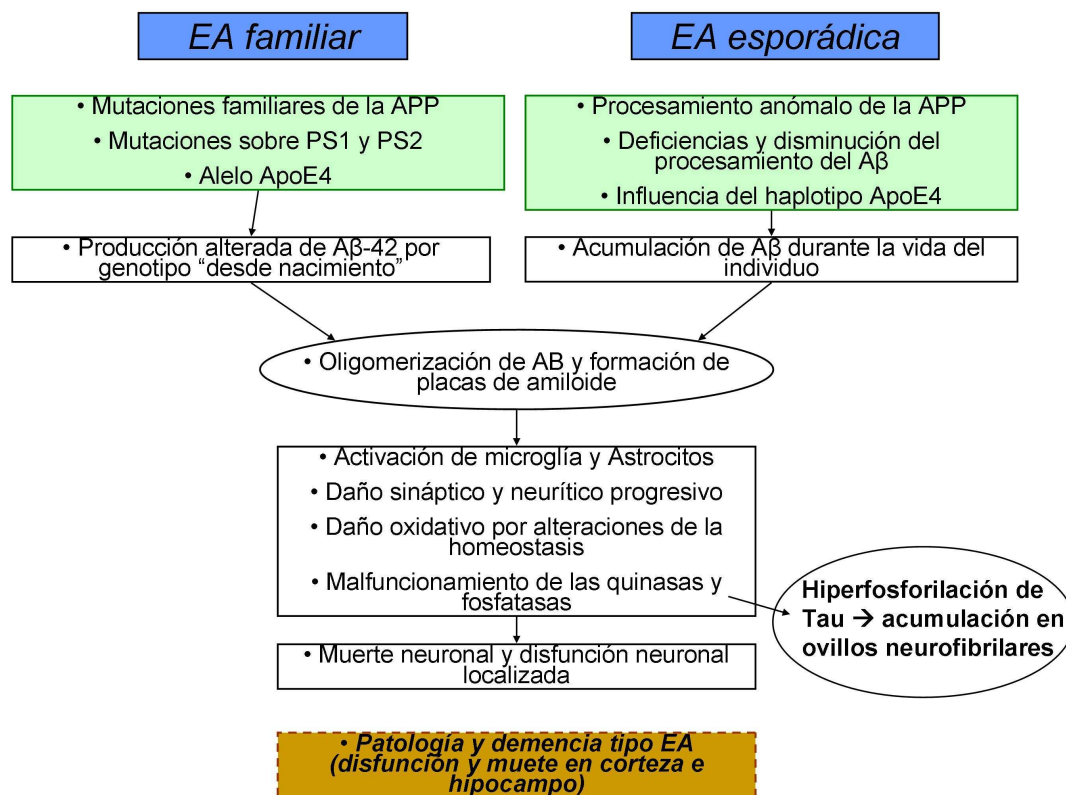


Figura 2. Esquema del progreso de EA familiar y esporádica según la hipótesis de la cascada del amiloide.

La APP se degrada en varios fragmentos por acción de unas enzimas, las secretasas: alfa (α), beta (β , también llamada BACE) y gamma (γ). Cada una de ellas realiza un corte específico en la proteína, produciendo un fragmento de amiloide que posteriormente es degradado por la maquinaria celular. Entre la Lys687 y la Leu688 por la α -secretasa, entre la Met671 y Asp672 por la β -secretasa y a partir de Ile712 por la γ -secretasa. No obstante, el corte de las enzimas no es siempre exacto, tanto la γ como la β -secretasa generan fragmentos amiloidogénicos, incluso conteniendo el fragmento A β intacto (Anderson y cols., 1992; Seubert y cols., 1992). El fragmento A β es una proteína de 4.2 KDa que aparece tras el corte proteolítico de APP en fragmentos de entre 40, 42 ó 43 aminoácidos que tienden a agregarse entre ellos y formar fibrillas, fibras, y finalmente placas de proteína que caracterizan la EA. La generación de dichos fragmentos se debe al corte de BACE, esta enzima oscila en el corte de los fragmentos, aumentando los fragmentos precursores de amiloide. Para la actividad de corte se necesitan las nicastrinas y las presenilinas, parte del complejo multimérico γ -secretasa que corta la APP.

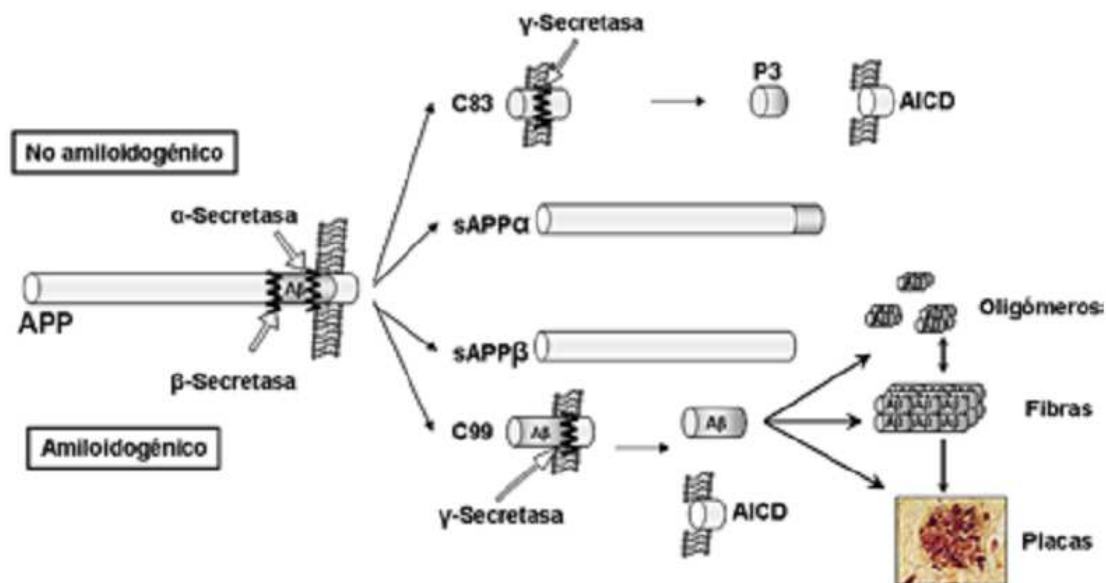


Figura 3. Corte amiloidogénico y no amiloidogénico de la proteína APP por las secretasas y su acumulación en placas de amiloide (Simon y cols., 2010). En la vía no amiloidogénica, se libera un gran fragmento soluble, el α -APPs y otro fragmento carboxiterminal, C83, sobre el cual actúa la γ -secretasa, dando lugar a p3 y al dominio intracelular de la APP (AICD). En la vía amiloidogénica, se libera β -APPs, y el fragmento carboxi-terminal C99. Este último fragmento es roto por la γ -secretasa, formándose AICD y el péptido Ab42/Ab40 que daría lugar a oligomerización.

En la neurona, la APP es sintetizada en el perikarion y es transportada por el flujo axonal hacia la terminal sináptica para probablemente implicarse en la interacción entre neuronas; A β se ha mostrado como ligando de receptores y otras moléculas (Schubert y cols., 1989; Koldamova y cols., 2001; Le y cols., 2001; Maezawa y cols., 2004) y como regulador en la sinapsis (Priller y cols., 2006) y de la plasticidad neuronal (Turner y cols., 2003). En su transporte por la barrera hematoencefálica responde modulando su expresión mediante una gran variedad de indicadores de estrés y produciendo reacciones pro-inflamatorias mediante la inducción de proteínas del complemento en regiones afectadas del cerebro (Paris y cols., 1999; Yasojima y cols., 1999; Lee, 2002). Además se ha observado como los anti-inflamatorios no esteroideos (AINE) reducen la aparición de la misma. La neuroinflamación se produce ante la activación de la microglía, que cambia su morfología y produce especies reactivas de oxígeno aumentando la toxicidad celular. Los cambios inflamatorios se podrían deber en principio a la acumulación de A β , esto revertiría en microgliosis ya comentada, astrogliosis, activación del sistema del complemento y la producción de citoquinas. Este tipo de actuación ha hecho que se relacione el A β con una función antimicrobiana, siendo además la única sustancia de actuación inmune específica en el cerebro. Esta idea propuesta por Soscia y su grupo (Soscia y cols., 2010) surge al obtener resultados similares al comparar la acción del péptido A β frente a conocidas sustancias con función antimicrobiana, incluyendo por tanto al péptido A β como parte del sistema inmune innato. Esto podría variar por completo la concepción y modo de tratamiento del APP en la EA, pasando a ser una clase de enfermedad autoinmune de desarrollo largo.

A pesar de que la presencia de las placas de amiloide es necesaria para el diagnóstico de la enfermedad, todavía existe controversia sobre su papel en la toxicidad (Tampellini y Gouras, 2010). El evento inicial que desata la selectiva muerte neuronal y la pérdida de sinapsis aún no esta completamente claro. Estudios recientes sugieren que el daño puede resultar de la conversión de los fragmentos no-patogénicos (es decir los que son eliminados de manera normal) a monómeros que sí implican toxicidad (Lansbury y Brice, 2002) (O'Nuallain y cols., 2010). Los polímeros y fibras de mayor tamaño que

normalmente contribuyen a la formación de las placas no serían tóxicas (Walsh y cols., 2002). Diversos estudios han demostrado que son los oligómeros de A β de 2 a 12 subunidades los que serían responsables del daño sináptico (Lacor y cols., 2007), por tanto, el papel de las placas podría ser de protección frente al fenómeno de toxicidad de sus unidades constituyentes "libres". Este hecho también está apoyado por los continuos hallazgos de pacientes controles sanos con alto contenido de placas, y otros pacientes demenciados, pero que no guardan relación directa entre carga de placas y nivel de demencia. Un estudio reciente ha puesto de manifiesto que la correlación de placas u ovillos y el grado de demencia es apreciable a los 75 años, pero es mucho menor a los 95 años de edad. Entre estas edades las placas neuríticas en el hipocampo disminuyen en personas con demencias y se ven aumentadas en los individuos sanos con la edad. Por tanto se puede sugerir que las lesiones típicas pueden servir como guía hasta los 85 años, a partir de esa edad deberíamos valorar también la atrofia cerebral como índice de la enfermedad (Savva y cols., 2009).

El procesamiento de la proteína APP y su deposición en la EA podría estar relacionado con diversos mecanismos incluyendo excesiva producción de APP, alteraciones de la secuencia, en el transporte, en la actividad de las chaperonas o en el procesamiento de proteínas y su degradación vía proteosoma (UPS) o lisosoma (Almeida y cols., 2006; Han y cols., 2008; Oddo y cols., 2008).

1.1.2 La proteína tau en la enfermedad de Alzheimer

La EA está directamente relacionada con la acumulación de la proteína tau en el cerebro en forma de ovillos neurofibrilares. Tau es una proteína de asociación a los microtúbulos (MAP en inglés) que conforman el entramado estructural y la dinámica de los microtúbulos en las células (Weingarten y cols., 1975), estabilizando los mismos (Caceres y Kosik, 1990). Además de encontrarse en diversos órganos (músculo, riñón etc...) se encuentra sobre todo en axones de células neuronales ya que en el sistema nervioso central (SNC) tau es la principal proteína asociada a los microtúbulos (MAP). Tau junto con tubulina estabiliza los microtúbulos promoviendo su ensamblaje mediante sus diferentes isoformas y la fosforilación. Tau está sujeta a diversas

modificaciones post-traduccionales, la fosforilación se puede dar en varios lugares de la proteína y esta influye negativamente en su afinidad por los microtúbulos, produciéndose al estar "libre" su acumulación en fibras en el citoplasma perinuclear (Hernandez y Avila, 2007). La mayoría de estas fibras tienen una estructura en hélice y su principal componente es la proteína tau hiperfosforilada (Grundke-Iqbal y cols., 1986b). Tau intracelular al fosforilarse no se une a microtúbulos y puede ser neurotóxica para la neurona, pero también su forma extracelular puede promover la neurotoxicidad, al encontrarse en equilibrio con la concentración intraneuronal de tau (Avila, 2010).

La importancia de la proteína tau en la EA esta creciendo en los últimos años. Así como se ha comentado que la proteína amiloide no refleja el nivel de pérdida neuronal presente en los pacientes, sí que se ha observado una relación más directa con los acúmulos de tau. De hecho se han publicado estudios *in vitro* e *in vivo* demostrando que la inactivación de la proteína tau implica una ausencia de los efectos tóxicos de A β (Rapoport y cols., 2002; Roberson y cols., 2007). Estos hechos apoyan la importancia del papel de tau en el proceso de neurodegeneración inducido por el péptido A β (Hernandez y Avila, 2010; Zempel y cols., 2010).

1.1.3 Activación microglial y neuroinflamación en Alzheimer

Numerosos estudios hipotetizan sobre el papel de la glía en la EA. Se considera que el A β puede activar la microglía y promover a través de la misma citoquinas, que producen neuroinflamación y factores de neurotoxicidad que producirían la muerte neuronal, por ejemplo IL-1 β , TNF- α (Coraci y cols., 2002). Se ha visto que TNF- α produce a su vez un aumento de la actividad de BACE1, aumentando por ello el corte de APP y la acumulación de A β retroalimentando el proceso (Yamamoto y Kazama, 2007). Esta teoría esta tan aceptada que incluso se ha llegado a considerar la EA como una enfermedad inflamatoria, no obstante muchos de estos descubrimientos se realizaron en estudios *in vitro*, en tejido "digerido", sin considerar la diferencia de comportamiento de la glía *in vivo*, donde se ha visto una reacción protectora (Streit, 2010). Pero por otra parte, la microglía también expresa receptores que promueven la limpieza del

amiloide (RAGE, CD36), con receptores para su fagocitosis y la síntesis de enzimas proteolíticas que rompen las placas (IDE, neprilina, MMP9 y plasminogen) (Simard y Rivest, 2006b; Yan y cols., 2006). Este doble papel de la glía en las enfermedades neurodegenerativas se puede explicar con las diferencias de una lesión aguda y una lesión crónica, en la que una inflamación aguda y local implica un aumento de la reacción frente a la agresión y recuperación del tejido, y una lesión crónica induce muerte neuronal. Se considera que una reacción inflamatoria persistente potencia la neurodegeneración y sobrepasa la respuesta protectora de la glía (Hickman y cols., 2008). Con la progresión de la enfermedad disminuye la expresión de receptores, que tienen capacidad de reacción para disminuir la aparición de las placas, pero la glía sigue manteniendo su función autocrina de inflamación y su función inicialmente protectora, se ve superada.

1.1.4 Factores genéticos de enfermedad de Alzheimer

El estudio de la etiopatología de EA sufrió una evolución lenta hasta 1985, cuando se observó que la influencia de la trisomía del par 21 presente en pacientes de síndrome de Down, producía acumulación de ovillos y placas seniles a edad temprana (Wegiel y cols., 2010), posteriormente se localizó la proteína APP en el centro del cromosoma. Se considera que las formas potenciales de EA por mutación del APP serían por alteración de la función de la proteína o del trastorno del procesamiento del A β produciendo su acumulación.

Se han identificado muchos genes en relación con la EA, 4 de ellos son considerados de relación probada con la enfermedad: APP siendo el gen de la proteína precursora del amiloide (cromosoma 21), PS1 y PS2 como los genes de la presenilina (cromosomas 14 y 1) y los portadores del alelo ApoE4 (cromosoma 19).

Locus	Gen (símbolo)	Cromosoma	Proporción	Edad de inicio (media \pm DE)
AD3	<i>PSEN1</i>	14q24.3	20-70%	44 \pm 8 años
AD1	<i>APP</i>	21q21	10-15%	49 \pm 7 años
AD4	<i>PSEN2</i>	1q31-q42	< 1%	59 \pm 7 años

DE: desviación estándar.

Tabla 1. Genética de las formas de EA con segregación autosómica dominante. (Modificado de Seto-Salvia 2010)

La EA se puede clasificar en función de su edad de inicio: siendo la anterior a los 60 años “forma temprana” de la enfermedad y posterior a los 70 “formas tardías”. La EA relacionada con los genes APP y presenilinas se ligán con formas familiares de la enfermedad de aparición temprana.

El alelo ApoE4 se considera un polimorfismo de riesgo de padecer la enfermedad, ya que incluso individuos con doble copia de este alelo, no tienen por qué finalizar en patología EA (Waring y Rosenberg, 2008). El gen de la apoliproteína E (ApoE) se sitúa en el brazo largo del cromosoma 19 y tiene relevancia en la aparición tardía, codifica una proteína de 299 aminoácidos, y se identificó como transportadora de colesterol en sangre. Es la variante alélica e4 (15% de la población total) la que incrementa el riesgo de EA (Seto-Salvia y Clarimon, 2010).

Alelo APOE	Población general española	Población con EA
ϵ 2	5%	4%
ϵ 3	85%	60%
ϵ 4	10%	37%
ϵ 4+ ^a	16%	58%

Tabla 2. Porcentaje de aparición de los diferentes alelos de APOE en la población española y en pacientes de EA. (Modificado de (Seto-Salvia y Clarimon, 2010).

1.1.5 El género, ¿modificador del riesgo de enfermedad de Alzheimer?

Algunos autores consideran la influencia de otro factor, el género, como un factor determinante (Payami y cols., 1996). La mayor esperanza de vida femenina, mayor presencia del genotipo ApoE4 (Farrer y cols., 1995; Bretsky y

cols., 1999) y una mayor distribución de las redes neuronales en mujeres (mayor bilateralidad) podría hacer más sensible a la toxicidad por A β al género femenino. Se le atribuye a la carga de estrógeno en el desarrollo neuronal y su posterior desaparición en la menopausia, como la responsable final en esta diferencia. También se han realizado estudios mostrando diferencias por género en la carga de amiloide en ratones transgénicos modelos de EA (King y cols., 1999; Turner y cols., 2001).

Sin embargo, muchos de los estudios epidemiológicos que sugieren una mayor prevalencia de la EA en mujeres pueden estar viciados por el impacto neuroprotector de la educación. Numerosísimos estudios (Arab y Sabbagh, 2010; Flicker, 2010) han demostrado un efecto protector de la educación sobre la EA. El hecho de que el acceso a la educación haya sido desigual en las generaciones que ahora se encuentran en la senilidad, ha hecho que las mujeres se beneficien menos de su efecto protector.

1.1.6 Modelos de enfermedad de EA

No existe en la actualidad ningún modelo que emule satisfactoriamente todos los aspectos de la EA, una enfermedad eminentemente humana (aunque existen enfermedades con acúmulos parecidos en monos y gatos) que además se desarrolla en décadas. No obstante existen múltiples aproximaciones: en cultivos celulares, moscas, pollos, gusanos, ratas y finalmente en ratones. Se ha planteado la posibilidad de usar modelos con mayor longevidad y cercanía filogenética (monos o delfines) o mayor parentesco en el desarrollo natural de la enfermedad como el *Octogon degu* chileno (van Groen y cols., 2009), pero lo avanzado de la tecnología de los transgénicos en ratones hace que sea la forma más eficiente, reduciendo de la ecuación el factor tiempo lo más posible para la obtención de resultados a corto/medio plazo (Tabla 3).

MODELO	Descripción
PDAPP	Expresan la forma cADN humana de la mutación "Indiana" con porciones de intrones APP. Desde los 6 meses los ratones heterocigotos desarrollan depósitos de AB en hipocampo y en paredes vasculares.
Tg2576	Expresan APP ^{swe} (isoforma 695 de hAPP con doble mutación sueca-K670N/M671L) bajo control de un promotor de hámster. Entre 10 y 12 meses comienzan a aparecer depósitos difusos y focales.
APP23	Expresan la mutación APP ^{swe} bajo el promotor Thyl1. Se forma un depósito en parénquima y vasos a los 6 meses de edad.

TgCRND8	Expresan APP (sueca e indiana) bajo el promotor de un prion de hámster. Desarrolla placas a los 3 meses. Un ratio elevado de AB42/40 y gran concentración de AB hacen que sea un modelo agresivo.
PSEN1 _{M146V} y PSEN1 _{M146L}	Los modelos demostraron la elevación de A β vía presenilinas.
PSAPP	Ratones dobles transgénicos APP + PS1, el gen mutado PS1 aceleró la patología amiloide.
APP _{dutch}	Expresan APP con la mutación danesa que cursa con hemorragia cerebral con depósito de amiloide. Angiopatía amiloide congófila severa. Enfermedad replicada generando una línea de ratón que expresa hAPP751 con la mutación E693Q bajo el promotor Thy1.
ARC6 y ARC48	Mutación “Artic” (E22G) se localiza en la secuencia AB. Favorece la oligomerización sin cambio en el ratio AB42/40.
BRI-A β ₄₀ o BRI ₄₂	Ratones expresando las isoformas AB sin sobreexpresión de APP.
JNPL3	Expresan 4RON y MAPT con la mutación P301L. Fue el primer modelo transgénico, con depósito de ovillos neurofibrilares y pérdida celular.
Tau _{P301S}	Expresan la isoforma más corta de 4R MAPT con la mutación P301S.
Tau _{V337M}	Con la mutación V337M con el promotor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).
Tau _{R406W}	Expresan 4R MAPT humana con la mutación WR06W bajo el promotor CAMKII.
rTg4510	Con MAPT inducible por sistema TET-off.
HTau	Expresan sólo la MAPT humana, es también un “Knock-out” para MAPT endógeno de ratón.
TAPP	Tg2576Xjnl3. Aumenta la patología de MAPT, parece que la APP mutada aumenta la patología de MAPT.
3xTgAD	Triple modelo que expresa APP _{swe} , MAPT _{301L} en un ratón PSEN1 _{M146L} .

Tabla 3. Modelos transgénicos mas importantes de la EA en ratón (modificado de (McGowan y cols., 2006).

Las isoformas de APP que resultan del splicing tienen un rango de 563 a 770 residuos peptídicos de longitud. La isoforma más abundante es la APP695, la forma predominante además en neuronas (Ko y cols., 1990). Se han identificado 5 mutaciones en la proteína APP en EA de tipo juvenil en diferentes familias, todas localizadas cerca del dominio A β (Goate y cols., 1991; Hendriks y cols., 1992).

Nosotros hemos usado el ratón transgénico Tg2576, con la llamada mutación “sueca”, denominada comúnmente como APP_{swe}. La elección original de este modelo fue en base a su desarrollo menos agresivo que otras líneas, teniendo que esperar hasta los 10 meses para comenzar a observar depósitos de amiloide. De esta manera, al realizar las pruebas con el doble mutante de parkina (PK-KO, mutación también de lento desarrollo) podríamos observar la

combinación de ambas patologías, sin el solapamiento de un fenotipo frente al otro y usar posibles estrategias neuroprotectoras.

1.2.1 La enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita por primera vez por James Parkinson en 1817 y es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común tras la enfermedad de Alzheimer, con una prevalencia de entre el 1% y el 3% de la población que supera los cincuenta años. Los síntomas considerados como parkinsonianos son: lentitud en los movimientos (bradiquinesia), temblor, rigidez muscular, dificultad al andar e inestabilidad postural. La administración de L-DOPA, precursor de la dopamina (DA) alivia al menos parcialmente estos síntomas en determinados pacientes. La característica patológica más llamativa y que es considerada como "hallmark" en la EP es la pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas (DAérgicas) de la sustancia nigra del mesencéfalo, que se asocia a una importante reducción de los niveles de DA en el estriado, y la desregulación de los circuitos neuronales que controlan el movimiento. Los síntomas aparecen de forma progresiva y sólo se manifiestan cuando la concentración de DA en el estriado ha disminuido un 60-80%, este hecho hace que al momento del diagnóstico la pérdida neuronal sea ya muy grande y dificulta tratamientos de neuroprotección (Shadrina y cols., 2010).

La gran mayoría de los casos de parkinsonismo primario son esporádicos e idiopáticos. A principios del siglo XX, Gowers describió que el 15% de los pacientes de EP tenían parientes afectados (Gowers, 1900), apoyando un importante componente genético/hereditario de la enfermedad. Durante el siglo pasado se consideraba que los principales causantes de la EP eran factores medioambientales, debido principalmente a la descripción por Constantin von Economo en 1917 del parkinsonismo post-encefáltico por infecciones víricas. Hoy se piensa que también puede tener un componente auto inmune (Dale y cols., 2004). Posteriormente se descubrieron los parkinsonismos inducidos por agentes como manganeso (Mena y cols., 1970), MPTP (Langston y cols., 1983), pesticidas como rotenona y paraquat (Barbeau y cols., 1985; Casarejos y cols., 2005) o fármacos como los agonistas de calcio

y neurolépticos (Mena y cols., 1995; Casarejos y cols., 2005; Casarejos y cols., 2006; Mena y de Yebenes, 2006). Sin embargo los primeros estudios con gemelos no mostraron susceptibilidad genética en esta enfermedad (Ward y cols., 1983; Marttila y cols., 1988).

1.2.2 Factores genéticos en la enfermedad de Parkinson

Durante los últimos tiempos se han descrito al menos 16 genes y loci genéticos asociados con EP y mutaciones en al menos 6 genes que causan formas familiares hereditarias de EP (Hardy y cols., 2006):

- *PARK-1. α -Sinucleína: Componente principal de los cuerpos de Lewy encontrados en EP. Se localiza en vesículas sinápticas y núcleo, donde se deposita, se encontró en cerebros de pacientes de EA y se llegó a llamar "componente no beta del amiloide". Se cree que tiene función en la liberación de neurotransmisores (Golbe y cols., 1990; Polymeropoulos y cols., 1996; Zarranz y cols., 2004; Lee y cols., 2006).*

- *PARK-2. Parkina: Actúa como una E3-ubiquitin ligasa, ubiquitina proteínas para su degradación vía proteosoma. Las mutaciones en este gen causan formas familiares autosómicas recesivas de Parkinson. Este gen se explica posteriormente.*

- *PARK-3: Gen aún no identificado.*

- *UCH-L1: Una mutación de este gen se identificó en una única familia de Alemania. UCHL1 es una ubiquitina hidrolasa, un componente importante del sistema del proteasoma que hidroliza y libera monómeros de ubiquitina de las proteínas ubiquitinadas. En estos momentos se duda de la importancia de este gen y se piensa que el hallazgo de Elisabeth LeRoy (Leroy y cols., 1998) puede ser un mero e inocente polimorfismo.*

- *PINK-1 (proteína quinasa inducida por PTEN): PINK-1 es una serina- treonina quinasa localizada en la mitocondria, en la que se han descrito múltiples mutaciones que provocan EP (Valente y cols., 2004; Marongiu y cols., 2007).*

- *DJ-1: Implican menos del 2% de los casos de AR-JP descritos.*

DJ-1 es una chaperona que se activa en respuesta a estrés oxidativo y se inactiva en ambientes reductores. Su sobre-expresión protege y su deficiencia sensibiliza a las neuronas DAérgicas frente a diferentes estímulos que provocan estrés oxidativo, y una vez oxidada DJ-1 inhibe la agregación de proteínas como la sinucleína (Shendelman y cols., 2004; Zhou y cols., 2006). DJ-1 puede funcionar también como proteasa (Olzmann y cols., 2004).

- *Dardarina, término derivado de la palabra dardara, o "temblor" en euskera, al haberse descubierto a partir del estudio de varias familias del País Vasco (LRRK 2, quinasa rica en repeticiones de leucina): El gen PARK8 codifica para una proteína llamada dardarina (Zarranz y cols., 2004; Khan y cols., 2005). De herencia autosómica dominante se ha descrito su asociación con estructuras de membrana como vesículas, retículo y mitocondrias (Biskup y cols., 2006). También se ha implicado en la regulación del citoesqueleto (MacLeod y cols., 2006) y colocalizando con tau en inclusiones neuropatológicas (Rajput y cols., 2006).*

<u>Gen</u>	<u>Proteína</u>	<u>Herencia</u>	<u>Función</u>	<u>Referencia</u>
PARK1 y PARK4	α-Sinucleína	AD	¿Tráfico vesicular?	(Polymeropoulos et al. 1997)
PARK2	Parkina	AR	E3-ubiquitina ligasa	(Kitada y cols., 1998)
PARK3		AD, IP	2p13	(Gasser y cols., 1998)
PARK5	UCHL1	AR	Ubiquitina hidrolasa	(Leroy y cols., 1998)
PARK6	PINK1	AR	Quinasa mitocondrial	(Valente y cols., 2004)
PARK7	DJ-1	AR	Chaperona, Respuesta a estrés	(Bonifati y cols., 2003)
PARK8	LRRK2	AD, IP	Quinasa citosólica	(Funayama y cols., 2002; Zarranz y cols., 2004)
PARK9	NF- M		1p36	(Lavedan y cols., 2002)
PARK10			1p32	(Hicks y cols., 2002)
PARK11	Apoe 4		2q23.1-q23.3	(Pankratz y cols., 2003)
	Sinfilina-1		Vesículas sinápticas	(Marx y cols., 2003)
	NR4 A2		Desarrollo neuronas TH+	(Le y cols., 2003)
	Tau		Citoesqueleto	(Pastor y cols., 2000)
	Gsk 3		Quinasa citoplásmica	(Kwok y cols., 2005)

	Glutation transferasa		Respuesta a estrés	(Vilar y cols., 2007)
--	-----------------------	--	--------------------	-----------------------

Tabla 4. Genes implicados en la EP, en negrita los genes que se ha confirmado en varias familias, que su defecto genético produce EP

No ha sido posible identificar un único elemento causal en el origen de la EP, y se debate en la actualidad si esta enfermedad es un conjunto heterogéneo de múltiples entidades con diferente etiopatogénesis. Se acepta que las principales causas de la pérdida de neuronas DAérgicas en la EP son: la disfunción mitocondrial, el aumento del estrés oxidativo, el mal funcionamiento de los sistemas de degradación de proteínas, y la activación microglial (Jenner y Olanow, 1996). Los agentes medioambientales mencionados, el envejecimiento y las alteraciones genéticas que se describen a continuación, son factores etiopatogénicos con efectos aditivos y a veces sinérgicos.

1.2.3 La proteína parkina, ¿factor modificante de la toxicidad por amiloide?

Tanto la enfermedad de Parkinson como la de Alzheimer, se caracterizan por la acumulación de proteínas (amiloide, tau, sinucleína, cuerpos de Lewy...) como punto clave, en su diagnosis final y posiblemente en el curso de la enfermedad. La parkina es uno de los genes relacionados con la EP, se postula que por sus múltiples funciones en la movilización de proteínas

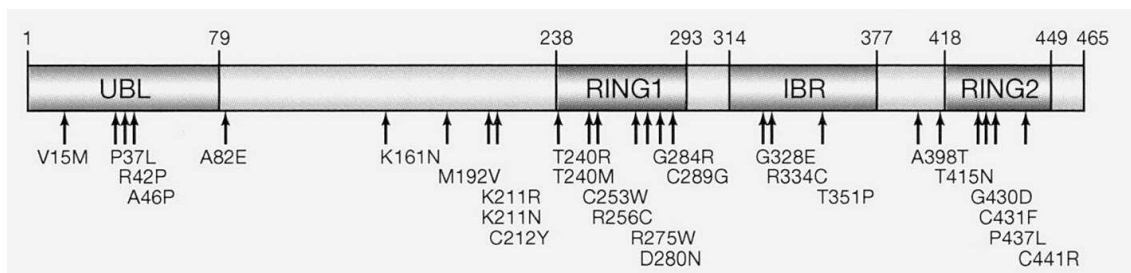


Fig. 4. Estructura y mutaciones descritas en la parkina. UBL: similar a la ubiquitina; RING: dominio proteico similar a los dedos de Zn; IBR: dominio entre los RING. La mayor parte de las mutaciones que causan patología están asociadas a los RING.

anómalas vía proteosoma, actividad en la transcripción y vía lisosomal. A su vez se han descrito proteínas con funciones similares (CHIP) que interaccionan con proteínas y actividades de limpieza de amiloide (con HSPs) relacionándose con la EA (Magrane y cols., 2004; Kumar y cols., 2007). Es posible que el

aumento de proteínas anómalas que aparece en la EA, pudiera relacionarse con una disminución de la efectividad en su eliminación, como parece producirse por la ausencia/malfuncionamiento de parkina en EP.

Las alteraciones en el gen *Park-2* se asocian de forma característica a la forma recesiva juvenil de la EP (AR-JP), y con menos frecuencia a otras formas. Este gen codifica para la proteína parkina, una E3 ubiquitina ligasa (Kitada y cols., 1998). El tamaño del gen *Park-2* es de 1,53 Mb y consta de 12 exones separados por regiones intrónicas (Kitada y cols., 1998; West y cols., 2001). El gen *Park-2* codifica para la parkina, una proteína de 465 aminoácidos y un peso molecular de 52 kDa. Se encuentran proteínas similares en *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, ratón, rata y otras especies (Horowitz y cols., 1999; Culetto y Sattelle, 2000; Kitada y cols., 2000; Bae y cols., 2003). Su estructura es modular (Figura 4), un dominio ubiquitina en la región N-terminal, una región central y dos dominios RING-finger (**R**eally **I**nteresting **N**ew **G**en) en la región C-terminal. Su promotor funciona bidireccionalmente regulando la transcripción de este gen, pero también de otro gen antisentido (West y cols., 2003) que tiene un tamaño de 0.6 Mb, de cinco exones, el "gen corregulado de *Park-2*" (PACRG).

Se han identificado muchos tipos de mutaciones: delecciones de uno o varios exones (Kitada y cols., 1998), duplicaciones o triplicaciones de exones, mutaciones de cambio en la pauta de lectura, mutaciones puntuales, etc... Las mutaciones en el gen de la parkina que se asocian a AR-JP se detectan tanto en homocigosis como en heterocigosis combinada o simple. En la mutación "simple" la pérdida de una de las copias del gen constituye un factor de riesgo para el desarrollo de la EP.

Se considera que las mutaciones en el gen *Park-2* producen el 50% de los casos de parkinsonismo juvenil hereditario autosómico recesivo (AR-JP), constituyendo un 10% del total de los casos. Las características de la AR-JP son: existencia de varios miembros de la familia afectados, un inicio temprano, síndrome parkinsoniano con aspectos clínicos anormales y ausencia de cuerpos de Lewy en el cerebro.

El fenotipo clínico, la histopatología y las diferentes mutaciones de las lesiones *Park-2* son muy variables, sin tener clara una gravedad fenotípica específica del truncamiento de la proteína. Se considera que grandes alteraciones de la proteína que anularían por completo su actividad llevarían a una EP de inicio precoz y patrón recesivo, mientras que las lesiones parciales que permiten el mantenimiento de una función residual o casos de hemizigosis tienen un patrón clínico más parecido a la EP clásica.

1.2.3.1 Parkina como E3 ubiquitin ligasa

La proteína parkina, como otras proteínas con dominios RING-finger, funciona como una E3 ubiquitin ligasa (Shimura y *cols.*, 2000; Zhang y *cols.*, 2000). Las E3 ligasas son proteínas que unen ubiquitina a diversas proteínas. El sistema de degradación de proteínas marcadas con ubiquitina a través del proteosoma juega un papel crucial en la regulación del nivel de proteínas que intervienen en la división celular, transducción de señales, regulación de la transcripción y metabolismo y controlar la calidad de las proteínas, degradando las mal sintetizadas u oxidadas (Schapira y *cols.*, 1990; Schubert y *cols.*, 2000). La ubiquitinización y su mal funcionamiento se encuentra muy relacionada con la acumulación, que es a su vez, un punto común de las enfermedades neurodegenerativas (Ciechanover y Brundin, 2003; Giasson y Lee, 2003; Moore y *cols.*, 2003).

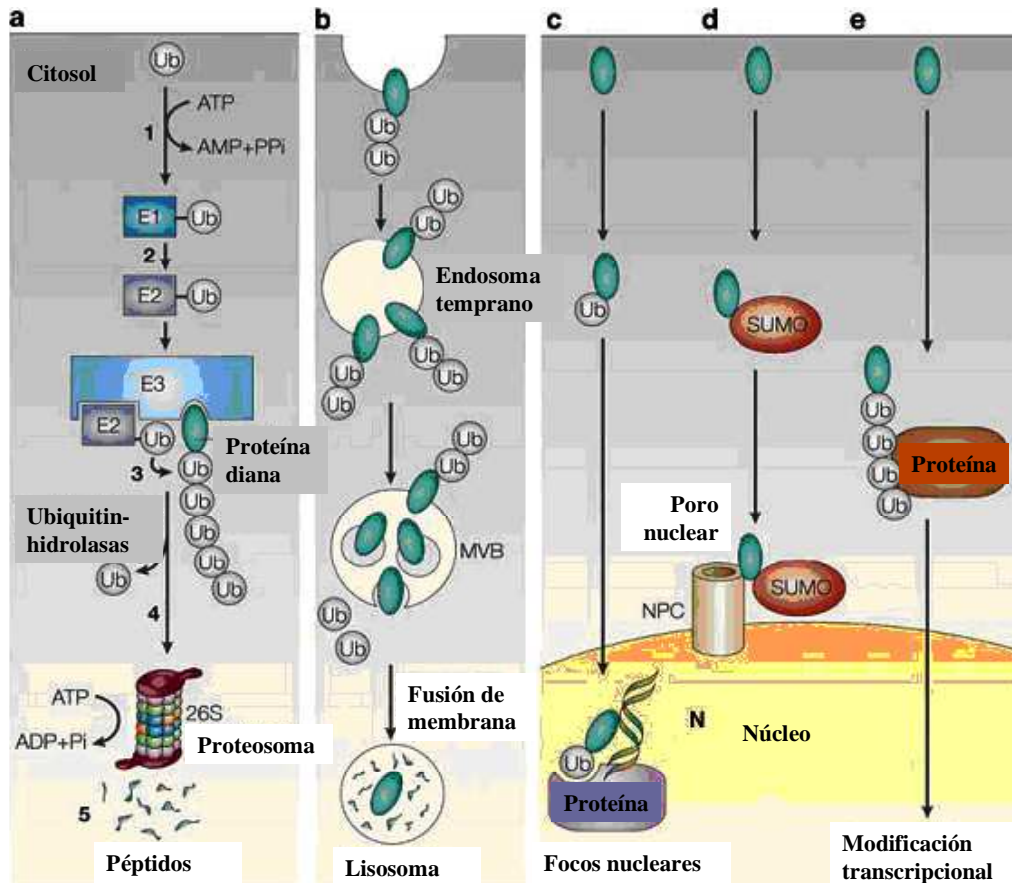


Figura 5. Diferentes funciones de la modificación proteica por ubiquitina. Modificado de (Ciechanover y Brundin, 2003) (a) Degradación de proteínas dependiente del proteasoma (b) Mono o oligo-ubiquitinización que dirige proteínas de membrana a su degradación en los lisosomas. (c) Mono-ubiquitinización (d) o modificación por proteínas similares a la ubiquitina (UBL) como SUMO pueden dirigir proteínas a diferentes destinos subcelulares, como complejos de transcripción o de traslocación al núcleo. (e) La unión de cadenas de ubiquitina a través de la Lys 63 puede provocar directa o indirectamente cambios transcripcionales.

La unión covalente de la ubiquitina con el sustrato se produce mediante la activación de una cascada enzimática en la que intervienen tres tipos de enzimas:

- E1 que activan la ubiquitina,
- E2 que conjugan la ubiquitina
- E3 (como la parkina) que ligan la ubiquitina al sustrato

En sucesivos ciclos de este proceso, varias moléculas de ubiquitina se unen al sustrato y forman una cadena de poli-ubiquitina que es la señal que reconoce el proteosoma para proceder a la degradación del sustrato. El sustrato es degradado por el proteosoma y la cadena de poli-ubiquitina se recicla por medio de enzimas como la UCH-L1 o la Ubiquitina hidrolasa

carboxi-terminal, que hidrolizan la cadena y regeneran monómeros de ubiquitina (Figura 6).

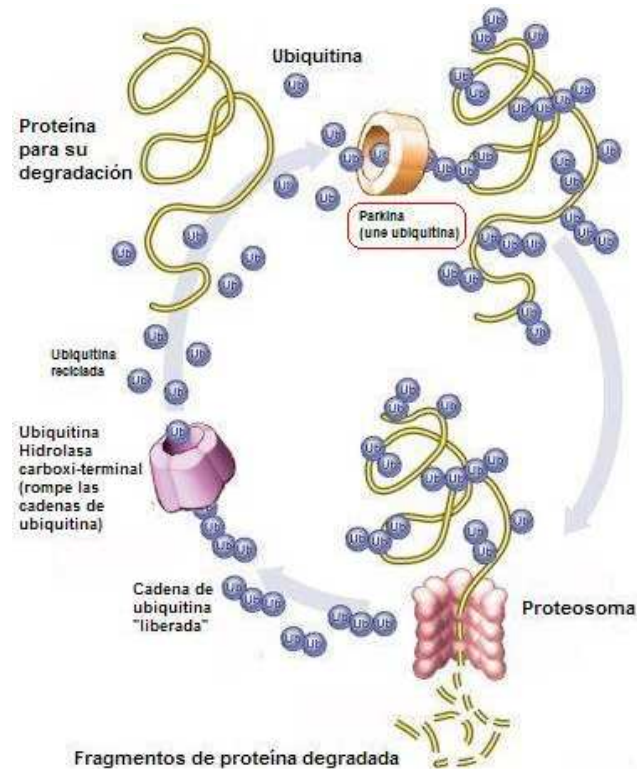


Figura 6. Esquema del funcionamiento de la proteína parkina en la degradación de proteínas vía proteosoma

En el caso de la parkina, las mutaciones asociadas a la EP autosómica recesiva, suelen impedir la interacción de la parkina con las enzimas E2 o con el sustrato y reducen o suprimen por completo su actividad ubiquitina- ligasa.

Al descubrirse su función se pensó que las mutaciones en el gen *Park-2*, que conllevan la supresión de la función de la parkina, producirían la acumulación de los sustratos de la parkina, lo que originaría la muerte selectiva de las neuronas DAérgicas en la EP. Se han descrito numerosos sustratos ubiquitinizados y dirigidos al proteosoma por la parkina, algunos presentes en los cuerpos de Lewy como: CDCrel-1 y 2, GRP37 (receptor del tipo de endotelina asociada a la parkina), p38, Sinfilina-1, α -sinucleína glicosilada, tubulina, Sinaptotagmina XI, Ciclina, RanBP2, Ataxina, SIM y FBP1 (Wakabayashi y cols., 2000; Zhang y cols., 2000; Imai y cols., 2001; Ren y cols., 2003; Ko y cols., 2005; Okui y cols., 2005).

Algunos de estos sustratos de la parkina que se encuentran implicados en enfermedades neurodegenerativas, en el tráfico microtubular de vesículas sinápticas e incluso en transcripción génica.

Además de la degradación proteasomal de estos sustratos, se postuló mediante herramientas bioinformáticas que los dos dominios RING-finger en el extremo C-terminal de la proteína parkina podrían tener un papel en la regulación de la expresión génica (Morett y Bork, 1999). Se ha descrito la interacción de parkina con factores de transcripción nucleares como SIM2 (Okui *y cols.*, 2005) FBP1 (Ko *y cols.*, 2006) o I κ B/NF κ B (Henn *y cols.*, 2007) y mitocondriales como TFAM (Kuroda *y cols.*, 2006). En este sentido, se ha demostrado que parkina está implicada en la regulación de la expresión génica en líneas celulares (Unschuld *y cols.*, 2006) y suprime la expresión de monoaminooxidasa (MAO-B), la enzima encargada de la degradación de la dopamina (DA) (Jiang *y cols.*, 2006).

Además del importante papel de la parkina en el marcaje de sustratos para su degradación vía proteosoma y su actividad como regulador transcripcional se ha implicado en la modulación de la endocitosis del EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico). Se la relaciona por la ubiquitinización independiente del proteosoma y activación de la quinasa AKT (Fallon *y cols.*, 2006).

La parkina también se encuentra implicada en la generación de radicales libres y el estrés oxidativo, uno de los aspectos más importantes en las enfermedades neurodegenerativas. El estrés oxidativo inhibe la actividad de parkina y provoca su agregación (Winklhofer *y cols.*, 2003; Muqit *y cols.*, 2004; Wong *y cols.*, 2007), y sin embargo la expresión de la proteína aumenta en respuesta a estrés (Yang *y cols.*, 2006). Su sobre-expresión protege las células de la apoptosis inducida por DA (Jiang *y cols.*, 2004a; Jiang *y cols.*, 2004b), la DA modificaría covalentemente a la parkina e inhibe su actividad (LaVoie *y cols.*, 2005) y su eliminación protege de la apoptosis inducida por L-DOPA en cultivos enriquecidos en neuronas mesencefálicas (Casarejos *y cols.*, 2005), debido a que los niveles de GSH aumentan en ausencia de parkina (Itier *y cols.*, 2003; Casarejos *y cols.*, 2005; Solano *y cols.*, 2006).

Hemos visto además, que los cultivos de neuronas y glía deficientes en parkina tienen elevados niveles de GSH, esto confiere protección frente a concentraciones de radicales libres que son tóxicas para cultivos WT (Solano y cols., 2006).

1.2.3.2 Modelos de eliminación genética de la parkina en ratones

La eliminación de la parkina en ratones ($PK^{-/-}$) se ha llevado a cabo utilizando diferentes estrategias. La eliminación de diferentes exones de la parkina en diferentes cepas de ratones, ha podido contribuir a que se obtengan distintos fenotipos (Goldberg y cols., 2003; Itier y cols., 2003; Palacino y cols., 2004; Von Coelln y cols., 2004; Fleming y cols., 2005; Perez y Palmiter, 2005). La delección del exón 2 es el único modelo que no presenta alteraciones en el comportamiento y metabolismo DAérgico. La delección del exón 7 muestra alteraciones en las neuronas TH⁺ del *locus coeruleus*, un síntoma de parkinsonismo. Los dos modelos en que se ha eliminado el exón 3 muestran aumento de la DA en el estriado y alteraciones del comportamiento dependiente de DA.

Nosotros hemos trabajado con los ratones sin exón 3 descritos por Itier (Itier y cols., 2003). En este modelo, no se han encontrado diferencias entre los ratones WT y $PK^{-/-}$ jóvenes en los niveles de tirosina hidroxilasa en la sustancia nigra. Tampoco en sustratos de parkina como la α -sinucleína, ubiquitina o sinaptofisina. Por el contrario, hay una reducción significativa en los niveles del transportador de la dopamina (DAT) y en el transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2), lo que se ha confirmado de forma independiente porque la parkina aumenta la expresión de DAT (Jiang y cols., 2004a; Jiang y cols., 2004b). La transmisión glutamatergica también está alterada. Los mayores niveles de DA y el incremento en el metabolismo de la DA por la monoamino oxidasa (MAO-B), aumenta el estrés oxidativo en el estriado de estos ratones. Este aumento se compensa con el incremento de los niveles de GSH en ratones jóvenes (Itier y cols., 2003). Sin embargo, en ratones viejos, los sistemas de neuroprotección dejan de funcionar y aparece un fenotipo parkinsoniano, con disminución de la zancada y pérdida de neuronas TH⁺ en la

sustancia negra y acumulación de proteína tau (Rodríguez-Navarro y cols., 2007).

II. La anestesia ¿factor externo modificador de la toxicidad en enfermedad de Alzheimer?

A medida que la esperanza de vida crece, resultado de una mejor calidad de vida, también el porcentaje de población que se encuentra expuesto a padecer demencia, de las cuales la más extendida es la EA, aumenta. Podemos suponer que los factores genéticos en términos poblacionales no han variado, por tanto los factores ambientales externos que influyen sobre esto cobran más importancia. Los factores externos juegan un papel crucial en el riesgo de padecer demencia, por ejemplo uno de ellos es la exposición a drogas, y los anestésicos entran dentro de este campo. La mayor parte de la población se ve expuesta en algún momento de sus vidas a anestesia general, y algunos autores apuntan la posible influencia sobre las demencias en las últimas etapas de la vida (Rasmussen, 2006; Eckenhoff y cols., 2008; Eckenhoff, 2008; Wei y Xie, 2009). Numerosos estudios epidemiológicos empezaron a sugerir esta relación entre el riesgo de padecer EA y el número de intervenciones quirúrgicas con anestesia general. Bohnen (Bohnen y cols., 1994a; Bohnen y cols., 1994b) sugirió que la exposición acumulativa a procesos de anestesia general antes de los 50 años estaba inversamente relacionada con la edad y gravedad de aparición de EA, aunque otros estudios muestran resultados diferentes (Mandal y cols., 2006; Mandal y Pettegrew, 2008a, b). Esta controversia puede deberse a que los resultados son menospreciados al no dar en ocasiones una significación importante, pero si una tendencia, y los trabajos aún necesitan de una estandarización de bases de datos. Recientemente se ha celebrado un simposium para recoger los resultados de las últimas investigaciones sobre el tema (Baranov y cols., 2009).

La disfunción cognitiva post-operativa (POCD en inglés) es una complicación común en medicina, que aparece en los días o semanas posteriores a la anestesia general (Rasmussen y cols., 2006; Newman, 2007; Caza y cols., 2008). Esta descrita en pacientes sometidos a procesos quirúrgicos (Moller y cols., 1998; Abildstrom y cols., 2000; Rasmussen, 2006; Newman, 2007; Newman y cols., 2007; Monk y cols., 2008) y sus factores de riesgo se solapan con los de la EA: edad, nivel educativo y genotipo ApoE

(Monk y cols., 2008; Eckenhoff y Eckenhoff, 2010). Comienza a considerarse que los anestésicos generales (especialmente los inhalatorios) podrían afectar a las capacidades cognitivas de los pacientes más allá del periodo post-operatorio, llegando a producir déficits cognitivos en aquellos individuos de mayor edad. Aún no se ha encontrado la relación definitiva entre anestesia, la cirugía y las demencias, pero a medida que se investiga parece clara su relación y adquiere más importancia (Peretz y cols., 2005).

2.1.1 La anestesia

Los anestésicos generales son los mayores depresores del SN que se conocen en medicina. Su efecto, que es considerado comúnmente como un sueño profundo, se acerca más al estado de coma farmacológico ó de "desvinculación cognitiva" desde el punto de vista sensorial. Los anestésicos son moléculas que actúan a nivel cerebral a pequeñas concentraciones, actuando sobre la sinapsis, enzimas e incluso sobre componentes del cito-esqueleto. A nivel corporal su uso afecta a funciones de control simpático, como son la regulación respiratoria y de temperatura, función cardiaca y hemodinámica, además de producir un estado post-anestesia de déficit cognitivo (desorientación, olvidos...), que es mayor cuanto más edad tienen los pacientes (POCD). Por este motivo, determinados pacientes que tienen una función cardiaca deficiente, problemas cardiopulmonares, tras traumatismos ó con una edad avanzada, deben de recibir dosis inferiores de anestesia. Además, existen algunos pacientes, que por motivos desconocidos, muestran una mayor "resistencia" a algunos anestésicos, produciendo "consciencia intra-operatoria" (el paciente manifiesta haber estado consciente durante la operación). En esta situación pueden llegar a sentir dolor y estar parcialmente conscientes, además de los ya más comunes efectos secundarios.

Hay varios estudios que vinculan estadísticamente la posibilidad de sufrir Alzheimer en edades avanzadas (Culley y cols., 2003) con el número de intervenciones sufridas a lo largo de su vida (Bohnen y cols., 1994a; Gasparini y cols., 2002; Lee y Gin, 2005). Esta correlación produjo un aluvión de trabajos sobre los anestésicos y la relación con la proteína acumulada por excelencia en EA, el β -amiloide (Eckenhoff y cols., 2004; Kvolik y cols., 2005; Palotas y cols., 2005; Mandal, 2007; Xie y cols., 2007; Culley y Crosby, 2008).

La anestesia general es en la actualidad uno de los pilares modernos de la medicina, no obstante la mortalidad relacionada con los procesos de anestesia general, se mantiene rondando cifras de 1 paciente por cada 13.000 operaciones en los últimos 15 años a pesar de los avances técnicos y nuevos anestésicos. Realmente, aún se desconocen muchos de los mecanismos de acción de los anestésicos, y por qué aparecen efectos secundarios, o por qué el estado cognitivo alterado es más duradero en pacientes de edad avanzada.

2.1.2 Empirismo en la anestesia

La realidad es que el desarrollo de la anestesia ha sido netamente empírico, siguiendo un proceso de “ensayo-error” desde el descubrimiento del éter en 1948 por William Morton. La mayor parte de los anestésicos actuales comparten estructura y por tanto propiedades y efectos clínicos con el éter, usado por Morton en Boston para facilitar su tarea como dentista. Dicho desarrollo empírico se basa en la capacidad de los nuevos derivados del éter (haloalcanos o haloéteres) para producir una serie de efectos deseados: sedación, inconsciencia, inmovilidad, amnesia, inmovilidad muscular y analgesia, todos ellos relacionados con actuaciones sobre el Sistema Nervioso Central (SNC) (Tabla 5).

SEDACIÓN	Excitabilidad reducida. Disminuye la actividad neuronal en las zonas corticales del cerebro.
INCONSCIENCIA	Anulación de respuesta frente a estímulos. Disminuye la actividad en zonas corticales y en el tálamo, zona de integración en procesos cerebrales.
INMOVILIDAD	Ausencia de motricidad frente a estímulos mecánicos. Supresión de la actividad neuronal en la médula espinal y cerebelo, zona de control motor.
AMNESIA	Ausencia de recuerdos durante el periodo de anestesia. Las moléculas de los anestésicos producen cambios en estructuras cerebrales involucradas en la formación de recuerdos: hipocampo, corteza prefrontal, amígdala, zonas motoras y sensitivas.
ANALGESIA	Ausencia de estímulos al dolor y relajación muscular. Se considera fruto de la caída de actividad en la médula espinal.

Tabla 5. Componentes del efecto anestésico y zonas cerebrales afectadas

A lo largo del siglo XX se postulaba que la función anestésica se conseguía por la interacción que producían las moléculas del anestésico con los componentes lipídicos de la membrana celular. La mayor parte de los anestésicos son productos liposolubles y de estructura variable, esta variabilidad hacía pensar que interactuaba de manera no selectiva sobre los receptores y relajaba los disparos neuronales. Posteriormente, lejos de esa idea, se consideró que su función era muy selectiva, y que dependiendo de los tipos de receptores de los distintos tipos neuronales, con los que interactuaba, se producían unos efectos u otros (o todos en conjunto), y se justificaban además los efectos secundarios "indeseados". En la actualidad, se relaciona su efecto con los receptores GABA_A postsinápticos (Sonner y *co/s.*, 2003) y extrasinápticos, fuera del botón sináptico (Lagasse, 2002; Rudolph y Antkowiak, 2004; Hemmings y *co/s.*, 2005; Cheng y *co/s.*, 2006) como los responsables del mantenimiento de la hiper-polarización de la membrana. Los receptores GABA podrían incluso ser activados por los anestésicos (actuando como ligandos) y mantener el silencio de la sinapsis. Otro aspecto muy importante, es la relación entre el uso de la anestesia y la oligomerización del β -amiloide en placas, punto clave para la etiopatología de EA.

Concentración Alveolar Mínima (CAM)

Los efectos farmacodinámicos de los gases anestésicos deben basarse en dosis dependiendo de la potencia de su efecto, y para valorar las dosis se usa la concentración alveolar mínima (CAM). CAM es la concentración de anestésico a 1 atmósfera de presión (760 mm Hg) que suprime los movimientos (normalmente supresión de movimiento muscular) frente a una simulación de intervención (varias pruebas, la clásica es una incisión en el abdomen) en el 50% de los pacientes (Saidman y *co/s.*, 1967; Quasha y *co/s.*, 1980), dato análogo a la llamada ED₅₀ usada en drogas intravenosas. Las recomendaciones de los fabricantes de anestésicos son de 1.2 a 1.3 CAM para asegurar la pérdida de consciencia por parte del paciente, aunque no esta asegurada la respuesta del mismo, la incidencia de problemas es mínima a estas concentraciones.

De todos modos, estos niveles de CAM son variables dependiendo de las drogas que se acompañen a su uso, ya sean relajantes musculares, hipnóticos, antieméticos, analgésicos, o un vehículo para el anestésico distinto al O₂, acompañándolo por ejemplo con óxido nítrico (NO) lo que aumenta su solubilidad. Los valores de CAM son "sumatorios" en muchas variables, si administramos 0.5 CAM de isoflurano + 0.5 CAM de NO es equivalente a 1 CAM a pesar de no llegar a los mínimos de las sustancias por separado en nivel de consciencia. Existen además diversos factores que varían los niveles de CAM necesarios para cada intervención, por ejemplo la hipotermia, el consumo de alcohol o la edad, sin que se sepa por qué influyen exactamente. Se considera que todos aquellos productos que reducen el nivel de neurotransmisión influyen negativamente en la CAM, aumentando los niveles necesarios para la obtención de los resultados requeridos (Miller D, 1994; Barash G, 2001).

2.1.3 La anestesia y la enfermedad de Alzheimer

La influencia de los anestésicos sobre el SNC y el organismo difiere según la edad, la variabilidad genética, el estado patológico, la eficacia y potencia (CAM) del producto utilizado etc... El cerebro es especialmente vulnerable a la neurotoxicidad en los "extremos" de la edad de un individuo, cuando experimenta los cambios del desarrollo inicial y cuando involuciona en los cambios sufridos en la senescencia (Culley y cols., 2007). El desarrollo inicial es un momento de gran vulnerabilidad, la barrera hematoencefálica aún no está completa y los efectos sobre los neurotransmisores pueden ser muy diferentes en el cerebro neonatal. Pero el cerebro senescente está también muy expuesto a la neurotoxicidad, en el cerebro de edad avanzada, como el inmaduro, aún existe neurogénesis aunque en menor grado (Eriksson y Koivikko, 1997) y sigue sujeto a los cambios de plasticidad sináptica necesarios para la adquisición y aprendizaje de nuevas informaciones. El cerebro senescente sufre la pérdida de neuronas, disminución de concentraciones de neurotransmisores y una marcada disminución de la neurogénesis y sinaptogénesis, así como acumulación de posibles productos tóxicos, como el β -amiloide y tau en EA. La vulnerabilidad del cerebro senescente es un punto preocupante en la administración de anestésicos generales porque la población

mayor de 85 años es un segmento creciente en el mundo desarrollado, además son los usuarios mayoritarios de las intervenciones quirúrgicas y la vulnerabilidad del SN aumenta con la edad. No se sabe si es por el envejecimiento *per se* o por enfermedades asociadas con la edad, se cree que puede deberse a un déficit de acetil-colina, dopamina, tirosina, serotonina u otros neurotransmisores, además de que se reduce, con el tiempo, el tamaño cerebral y las células gliales en favor de líquido cefalorraquídeo (Miller D, 1994). El cerebro senescente tiene menos reserva y una capacidad más limitada de respuesta para compensar agresiones, por lo que pequeños incidentes de toxicidad pueden tener un gran impacto en su funcionamiento. Se ha demostrado que la anestesia podría ser una de estas "agresiones" al cerebro, no solamente produce la muerte neuronal sino que interfiere con procesos neuronales más complejos, estas drogas tienen mecanismos de acción específicos, pero también tienen mecanismos comunes de neurotoxicidad y acumulación de proteínas.

Los anestésicos empleados en la actualidad se dividen en dos grupos principales: *gases inhalados* de los cuales halotano, isoflurano y sevoflurano son los más conocidos, e *inyectables* como el etomidato, la ketamina y sobre todo el propofol. Los inhalatorios (haloalcanos o haloéteres) difieren en el tamaño de su molécula, y se considera que el tamaño de la molécula influye directamente en la toxicidad que producen, así como, en la capacidad de agregación con péptidos amiloides, siendo los de menor tamaño molecular los que aumentan significativamente la oligomerización (Figura 7). Según esta hipótesis de oligomerización, el efecto de los anestésicos se sustenta por la interacción de estas moléculas hidrosolubles con los fragmentos de amiloide, interactuarían con las α -hélices de los fragmentos de β -42 "acercándolos", facilitando y estimulando la oligomerización y finalmente produciendo la formación de las placas (Mandal, 2007). Otros trabajos aluden, a que no solo se produce esta interacción, sino que además se producen cambios estructurales en las uniones de los fragmentos de APP, pasando de uniones α -hélices a barriles- β , aumentando su insolubilidad y agregación (Eckenhoff, 2001).

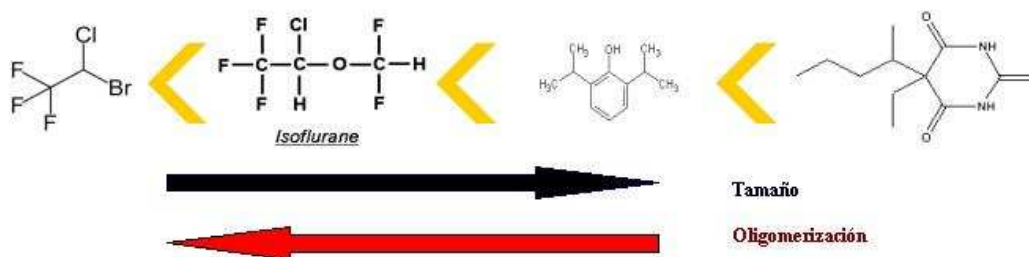


Figura 7. Relación entre tamaño y capacidad de oligomerización de los anestésicos: Halotano, Isoflurano, Propofol, Thiopental

2.1.3.1 Efectos de anestésicos en cultivos neuronales

Los efectos de los anestésicos se han probado en cultivos neuronales, Zhang (Zhang y cols., 2008a) mostró la necesidad de añadir tratamientos de hipoxia a la aplicación de desflurano para producir amiloidosis y activación de las caspasas. El mecanismo de toxicidad se relacionó definitivamente con la cascada de amiloidosis, gracias a los trabajos usando el clioquinol o nemantina, que bloquean los procesos de oligomerización, lo que reducía la muerte por apoptosis. El isoflurano, pero no el sevoflurano, inducen citotoxicidad en PC12 de rata. También *in vitro* se demostró una cierta relación de riesgo con patologías relacionadas con la EA, células PC12 transfectadas con la mutación de la presenilina-1 mostraron mayor vulnerabilidad a la citotoxicidad por anestesia (Liang y cols., 2008).

2.1.3.2 Efecto de anestésicos en experimentos *in vivo*

Se han publicado varios estudios *in vivo* estudiando la influencia de la anestesia en modelos animales (Tabla 6), estudios donde se observa una mayor sensibilidad de animales transgénicos modelos de EA frente a procesos de potenciación de toxicidad vía amiloidogénesis. Por ejemplo, se ha observado que ratones modelos de EA son menos sensibles frente a los efectos hipnóticos de los anestésicos frente a ratones controles (Bianchi y cols., 2008) (Bianchi y cols., 2010), y que además muestran unos valores de CAM mayores que sus paralelos WT (Eckel y cols., 2010). Debe existir por tanto, vulnerabilidades genéticas y neuropatológicas asociadas con la patología Alzheimer frente a procesos anestésicos. Se ha demostrado como los anestésicos producen déficits en el aprendizaje en ratones en desarrollo (Jevtovic-Todorovic y cols., 2003; Ma y cols., 2007) y en animales de edad

avanzada dicha exposición produce una disminución cognitiva persistente (Culley y cols., 2004; Crosby y cols., 2005). Animales de edad adulta, expuestos repetidamente a isoflurano, muestran sensibilidad diferenciada en aquellos animales modelos de EA. Parece que los efectos amnésicos de los anestésicos se llevan a cabo en la transmisión de GABA, animales "knockout" de la subunidad de GABA tipo A se muestran mucho más resistentes a los efectos (Rau y cols., 2009), pero otros efectos fruto de la anestesia (disminución de ritmo respiratorio, control de la temperatura...) deben de relacionarse con la influencia sobre los segundos mensajeros, como proteínas G (Icaza y cols., 2009).

Modelo animal	Tipo de anestesia	Parametros de estudio	Resultados	Referencias
Ratas (Sprague-Dawley) 200-250 gr.	Propofol, Tiopental	WB, Amiloidosis, POCD*	Sin cambios en la cascada de A β y compuestos seguros	(Palotas y cols., 2005)
Tg2576 ratones transgénicos y controles de 12 meses de edad	Isoflurano, Halotano, (0.8 CAM, repetido 5 días)	IHQ, Amiloidosis, Morris water maze	Halotano afecta comportamiento y amiloidogénesis	(Bianchi y cols., 2008)
Ratones C57B6	1.4% Isoflurano, (2 horas)	IHQ, β -secretasa BACE, WB	Aumentan niveles de caspasa-3 y BACE \rightarrow 24 horas tras anestesia	(Xie y cols., 2008)
Ratas (neonatas y de 16 meses)	Isoflurano CAM (4 horas)	Condicionamiento al miedo, Morris Water Maze, muerte celular y neurogénesis	Muerte celular, neurogénesis y respuesta neurocognitiva no afectada	(Stratmann y cols., 2010)
Ratones APP/Tau/PS1 (12 y 14 meses)	Isoflurano, Sevoflurano, Halotano (CAM)	Emergencia de la anestesia y test de CAM	Menor sensibilidad de transgénicos a concentraciones de CAM	(Bianchi y cols., 2010)
Ratones APP23 y APP51/16 (4 a 18 meses)	Isoflurano 1-2%	CAM	Mayores niveles de CAM en ratones APP23	(Eckel y cols., 2010)
Ratones C57B6 (hembras)	Isoflurano (4% inducción, 1-2% mantenimiento) e Ibuprofeno	Recuperación post-operatorio y condiciones ambientales	Mejor recuperación en ambiente enriquecido y social	(Pham y cols., 2010)

Tabla 6: Estudios recientes de anestesia en modelos animales

Se sabe además, que tras las intervenciones muchos pacientes de edad avanzada sufren procesos de desorientación, pérdida de memoria, incapacidad de concentrarse propios del síndrome llamado POCD. Como hemos comentado las variables de riesgo para la EA y el POCD se solapan, y hay investigaciones que apuntan hacia cambios funcionales similares en ambos procesos (Abildstrom y cols., 2000; Xie y Tanzi, 2006; Newman, 2007; Newman y cols., 2007). También se ha considerado que el isoflurano y su inducción a la oligomerización de A β , aumento de apoptosis y relación con EA podría ser un punto de unión entre los delirios temporales, fruto de las intervenciones con anestesia general, y la demencia a más largo plazo (Xie y cols., 2006b).

2.1.3.3 Características del isoflurano

El isoflurano (1-cloro-2,2,2-trifluoroetil difluorometil eter), es un líquido no inflamable, incoloro, químicamente estable, no precisa de ninguna mezcla para su preservación, y a temperatura ambiente se mantiene hasta 5 años. Es un éter halogenado usado como anestésico inhalatorio. Su uso en medicina humana está empezando a declinar, siendo sustituido con el sevoflurano, desflurano y el intravenoso propofol, pero aún se usa mayoritariamente en veterinaria. El isoflurano es siempre administrado directamente en aire u oxígeno 100%, aunque también se utiliza con óxido nitroso, bajando su CAM. Tiene unas propiedades físicas que le confieren buena inducción, una rápida vaporización, pero puede irritar el sistema respiratorio. Se utiliza normalmente para el mantenimiento de la anestesia general previamente inducido por una droga intravenosa, como propofol o tiopental. En comparación con los más antiguos agentes inhalatorios, halothano y enflurano, su bajo coeficiente de solubilidad sangre-gas hace que la inducción de la anestesia y la recuperación sean rápidas.

Reduce el metabolismo cerebral y en consecuencia disminuye las necesidades de O₂ en el cerebro. No tiene propiedades convulsionantes y no causa cambios epileptiformes en el electroencefalograma (EEG). A bajas concentraciones no produce incremento del flujo sanguíneo cerebral pero por encima de 1 de CAM hay una subida dosis-dependiente. Este fármaco disminuye las resistencias vasculares provocando una discreta caída de la presión arterial media (PAM), tiene efecto vasodilatador, provoca una ligera

taquicardia refleja pero no ejerce ninguna acción potenciadora de las catecolaminas, se caracteriza por una marcada estabilidad del ritmo cardiaco. Tiene una acción depresora del sistema respiratorio intermedia, la respuesta a la hipoxia y a la hipercapnia se encuentra disminuida, también produce broncodilatación.

2.1.3.4 ¿La anestesia factor neurotóxico?

Los anestésicos no son inertes y su metabolización *in vivo* puede implicar intoxicación aguda o incluso crónica, dependiendo de su estructura, liposolubilidad, mecanismo de acción, potencia (medida en CAM para cada anestésico) y especificidad (Miller D, 1994). Por lo que no sólo se ha relacionado la anestesia con los procesos de oligomerización, sino también de manera muy clara con un aumento en la muerte neuronal (Thornberry, 1999; Eckenhoff y cols., 2004; Xie y cols., 2006a; Mandal y cols., 2007; Ouyang y cols., 2007; Xie y cols., 2007), produciendo un aumento de la actividad de las caspasas (Figura 8), mediante la variación del Ca^{2+} citosólico en neuroglioma humano transfectado con APP (Zhang y List, 1996; Xu y cols., 2000; Kvolik y cols., 2005; Ouyang y cols., 2007; Zhang y cols., 2008b). En experimentos realizados *in vivo* en ratones controles (C57B6) el isoflurano aumenta la expresión de las caspasas y expresión de BACE (reduciendo su degradación), lo que conllevaría un mayor corte de APP y acumulación de amiloide. Además se ha visto como el clioquinol, agente con capacidad atrapadora de amiloide, reduce la apoptosis, por tanto parece que la muerte neuronal esta directamente relacionada con la cascada de amiloidosis (Bianchi y cols., 2008; Culley y Crosby, 2008; Planel y cols., 2008).

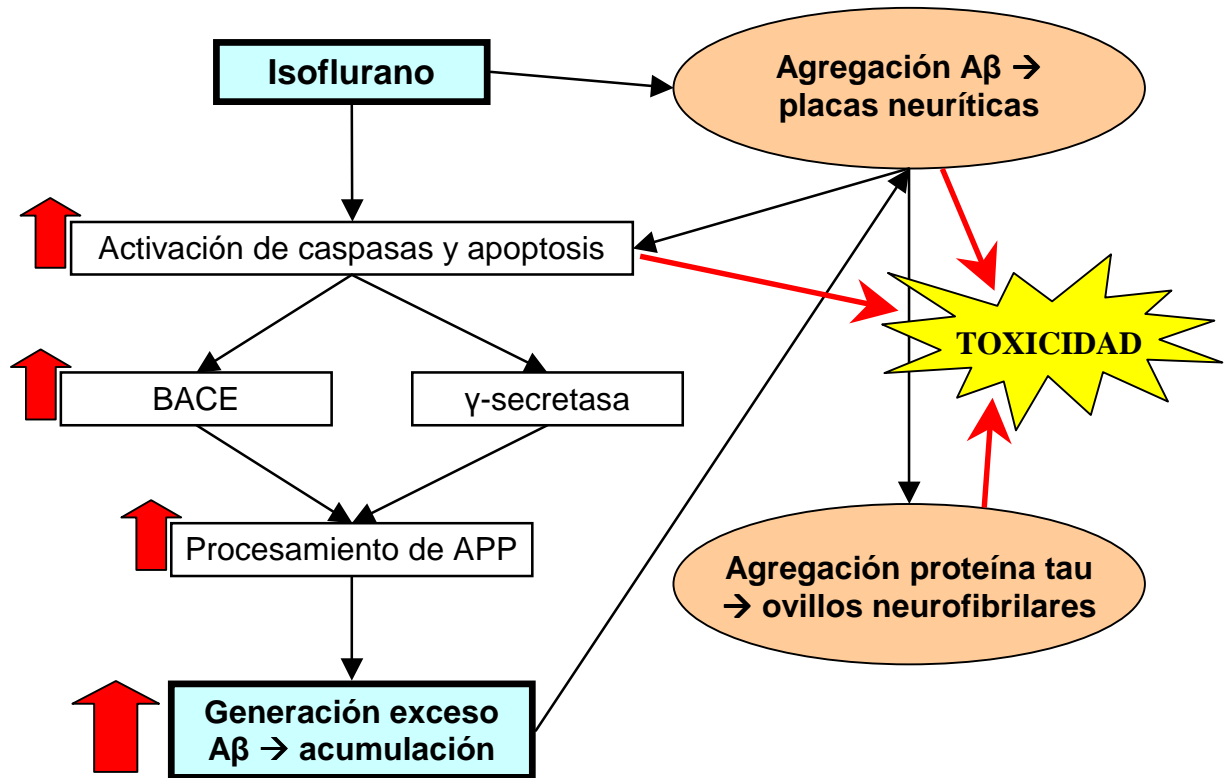


Figura 8. Esquema de la hipótesis de influencia del isoflurano en la agregación final de placas neuríticas y ovillos neurofibrilares

2.1.3.5 La anestesia y su influencia en la proteína tau

Además de la relación de la anestesia con el amiloide se ha estudiado también con la proteína tau. La proteína tau tiene función estructural en la estabilización de los microtúbulos, y al ser fosforilada tiende a agregarse formando los ovillos neurofibrilares clásicos en la patología de EA. Existen trabajos que afirman que la anestesia, dependiente del tiempo de exposición e independiente del anestésico aumenta la fosforilación de la proteína tau (Planel y cols., 2007; Run y cols., 2009). Esta interacción sería un tercer argumento, junto con la oligomerización del amiloide y la neurodegeneración observada, para justificar la interrelación epidemiológica vista entre EA y anestesia, y quizá también con la disfunción cognitiva en el periodo post-operatorio. No obstante este efecto podría no ser directo, hay trabajos que parecen apuntar a que la acumulación de tau por anestesia se elimina cuando se controlan variables como la hipotermia (Planel y cols., 2007).

III. La trehalosa como factor neuroprotector de la toxicidad por anestesia en un modelo de enfermedad de Alzheimer

3.1 La trehalosa

El uso de osmolitos en la naturaleza para la estabilización de proteínas es algo muy extendido, estos reaccionan frente a situaciones de estrés aunque sus mecanismos de actuación no se conocen plenamente. Los osmolitos abarcan un amplio número de solutos, desde polifenoles, aminoácidos y sus derivados hasta azúcares como la trehalosa (Ignatova y Gierasch, 2007).

La trehalosa es un polvo blanco, sin olor y tiene aproximadamente la mitad de capacidad edulcorante que el azúcar. Es un homodisacarido con dos glucosas unidos por un enlace glucosídico. Debido sus propiedades inherentes la trehalosa es utilizada en la industria farmacéutica, alimentaria, cosmética (Richards *y cols.*, 2002) y se ha usado como protector de la estructura proteica en una gran variedad de campos (Tabla 7). La trehalosa esta presente además en la naturaleza cumpliendo multitud de funciones no solo en hongos y plantas, también por ejemplo en bacterias donde en procariotas es fuente de carbono, como componente estructural, soluto en cianobacterias (Arguelles, 2000) o formando parte de la pared celular en micobacterias. Es un azúcar muy abundante también en insectos, donde es el carbohidrato mayoritario en insectos voladores por su alta capacidad energética (de una molécula se sacan dos de glucosas mediante hidrólisis), y esta presente en la hemolinfa. En el reino animal se ha encontrado en nemátodos y tardígrados, se considera a la trehalosa responsable de la resistencia de estos a las agresiones (Jonsson, 2007).

En los llamados “animales superiores” curiosamente no se produce de manera endógena, pero si se mantiene la enzima que la degrada, la trehalasa. Específicamente en los humanos dicha enzima se encuentra en el intestino delgado y en los riñones (Sasai Takedatsu 1996).

Aplicaciones	Referencias
En modelos de osteoporosis en ratón y como posible tratamiento en humanos	(Arai y cols., 2001) (Yasushi Nishizaki, 2000)
Agente estabilizador de moléculas en industria farmacéutica frente a estrés	(Schwendeman y cols., 1995; Jain y Roy, 2008)
Como estabilizador de vacunas	(Crowe y cols., 1994)
En la preservación de células de mamífero contra la desecación, hipoxia y agregación por anoxia	(Guo y cols., 2000; Haddad y Ma, 2001; Chen y Haddad, 2004)
Como agente protector frente a estrés térmico	(Sun y cols., 1997)
Como crioprotector en oocitos y fibroblastos humanos	(Eroglu y cols., 2000; Eroglu y cols., 2002)
En modelo de enfermedad de Huntington en ratón	(Tanaka y cols., 2004)
Para contrarrestar la agregación de proteínas prionicas y daño oxidativo	(Beranger y cols., 2008; Aguib y cols., 2009)
Interacción con la proteína β -amiloide en la EA	(Liu y cols., 2005b; Izmitli y cols., 2010)
En el tratamiento de patología tau y amiloide en modelo doble transgénico Tau ^{vm} / PK ^{-/-} de ratón	(Rodriguez-Navarro y cols., 2010)

Tabla 7. Aplicaciones de la trehalosa en la industria e investigación

3.1.1 Papel de la trehalosa como bioprotector

Hay diversas hipótesis sobre como actúa la trehalosa para conseguir su papel protector de estructuras, una de ellas se basa en las características morfológicas propias de la trehalosa. La trehalosa es polimórfica, tiene varios estados intermedios y al menos dos estados finales cristalinos. La transformación en estos estados es reversible y se realiza mediante la hidratación. Uno de los estados, el anhídrido ($C_{12}H_{22}O_{11}$, forma anhídrica, peso molecular: 342.3 g mol^{-1}) carece de moléculas de agua, no obstante al hidratarse pasaría al estado dihidrato ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 2H_2O$, forma di-hidrato, peso molecular: 378.3 g mol^{-1}) sin perder la consistencia cristalina. Los estados cristalinos tienen normalmente muy baja viscosidad, por lo que el movimiento de las moléculas es muy limitado y se ven inmovilizadas, "encapsuladas" dentro de la estructura cristalina manteniendo su estabilidad frente a situaciones de estrés. Basándose en esta capacidad hay una teoría sobre la protección mediada por trehalosa: la teoría de la inmovilización ó "vitrificación".

La trehalosa actuaría manteniendo y conservando las estructuras en su forma cristalina (Qiang Liu, 1997) frente a por ejemplo, la desecación y se permitiría la recuperación de la normalidad con la rehidratación posterior, lo que recupera la movilidad de las moléculas previamente "atrapadas" (Crowe y *cols.*, 2001; Sussich y *cols.*, 2001).

La trehalosa ha sido implicada en la protección de estructuras no solo frente a la desecación sino también a los procesos de congelación, o de estrés inducido por frío. Se hipotetiza que la trehalosa previene la activación y la agregación proteica frente a bajadas de temperatura y además estabiliza la membrana retrasando el cambio de fase de cristalina a fase de gel (Kandror y *cols.*, 2002), además aumenta la viscosidad de el líquido citoplasmático lo que disminuye el riesgo de formación de cristales de agua en la congelación, lo que causaría grandes daños en la célula (Rudolph y *cols.*, 1986).

Otra de las hipótesis de las propiedades de la trehalosa se atribuye a su clasificación como sustancia "cosmótropa", es decir la afinidad de su molécula con el agua es mayor que la del agua por si misma (trehalosa-agua > agua-agua) y este hecho se considera que reduce la posibilidad de formación de cristales introduciéndose en la estructura del agua, siendo un excelente crioprotector. En esto se basa la teoría de "exclusión preferencial" en situaciones de exceso de agua, en la que la trehalosa competiría con la proteína por las moléculas de agua estructurándolas a su alrededor y manteniéndolas alejadas de la proteína, aumentando por tanto su compactación y mejorando su estabilización (Timasheff, 1993; Sola-Penna y Meyer-Fernandes, 1996). Según esta teoría la acción de la trehalosa se produciría sin interacción directa con la proteína, lo que la distingue de la llamada teoría de "sustitución de agua".

La teoría de la sustitución de agua implica el reemplazo del agua por la trehalosa alrededor de la proteína, habría por lo tanto un papel directo en la protección. La trehalosa mantendría la estructura nativa de la proteína manteniendo la estructura en 3 dimensiones de la misma, formando puentes de hidrógeno y aumentando su estabilidad (Crowe y *cols.*, 1984; Liu y *cols.*, 1996; Cho, 1997).

Las tres teorías no son excluyentes, de hecho se considera que la actuación de la trehalosa como protectora podría variar dependiendo de la

cantidad de soluto en la cuál se encuentre la biomolécula. Es probable que se aúnen las tres posibilidades dependiendo de las condiciones, no obstante la capacidad de biopreservación de la trehalosa no se debe exclusivamente a su papel como soluto, también implica a otras vías en la neuroprotección que aumenta el interés puesto en ella como tratamiento, como por ejemplo, su capacidad de inducción de la autofagia.

3.2 La autofagia

Como hemos visto, las enfermedades neurodegenerativas como EA, EP, enfermedad de Huntington y ataxias están relacionadas con el depósito anómalo de proteínas. Uno de los sistemas de degradación de acúmulos de proteínas junto con el proteosoma es la autofagia. Mientras que el UPS degrada las proteínas citosólicas y de vida media corta, debido al tamaño de su poro en el complejo que forma el autofagosoma, la autofagia se concentra en la degradación de proteínas de mayor tamaño y complejidad, de vida larga e incluso órganos celulares no funcionales.

Durante la autofagia se produce una elongación de la membrana citoplasmática englobando partes del citoplasma con los productos a digerir y formando los fagosomas (autofagosomas si la partícula englobada finalmente es de la propia célula). Estas vesículas de doble membrana se funden con los lisosomas, vesículas que contienen enzimas de degradación dependientes de pH, para formar los lisosomas (autolisosomas en el caso de degradación autógena de la célula). La única proteína conocida en mamíferos que se une a los autofagosomas es el LC3, de las cual hay dos formas: I y II. Tras la activación de la autofagia la forma I citosólica se conjuga con fosfatidiletanolamina y resulta la forma de LC3-II (Sarkar y Rubinsztein, 2008). También la Beclina-1 es una proteína clave para la autofagia y el p62 se considera un sustrato de los procesos de autofagia (Stumptner y cols., 1999; Babu y cols., 2005; Bjorkoy y cols., 2005).

Debido a su carácter común de acumulación de proteínas existen varios estudios sobre el posible papel de la autofagia en las enfermedades neurodegenerativas (Hara y cols., 2006; Komatsu y Ichimura, 2008; Sarkar y

Rubinsztein, 2008), se considera que aumentar la reacción autofagica podría ser una posible estrategia para disminuir la agregación de dichas proteínas y con ello la toxicidad.

3.2.1 La autofagia como tratamiento frente a proteinopatías

La inducción de la autofagia mediante métodos químicos se ha observado que protege contra la toxicidad por acumulación de proteínas degradándolas. Existen en la actualidad varios compuestos que cumplen esta función (Tabla 8) siguiendo diferentes métodos:

- *Inhibidores de mTOR: Diana de la rapamicina, que es la llave reguladora del crecimiento celular y proliferación, su expresión inhibe la autofagia. La rapamicina inhibe mTOR, por tanto induce la autofagia (Noda 1998) y la eliminación de proteínas agregadas.*

- *Agentes reguladores de Inositol: Drogas reguladoras del humor como el litio, la carbamazepina, el ácido valproico que disminuyen los niveles de Inositol (Williams y cols., 2002), o compuestos como L-690,330 también influyen en la autofagia (Sarkar y cols., 2005), mediante la inhibición de la fosforilación de inositol impidiendo su reciclaje (Berridge, 1993).*

- *Moléculas potenciadoras de la rapamicina: 3 compuestos "SMERs" inducen autofagia de manera independiente a m-TOR (Sarkar y cols., 2007).*

- *Drogas aprobadas por la FDA: 7 compuestos se identificaron como inductores de la autofagia independiente de m-TOR (fluspirilina, trifluoperacina, primocida, niguldipina, amidarone, loperamina y penitrem A). Algunas de las drogas tienen efectos secundarios indeseables con su uso continuado.*

- *La trehalosa: Es un disacarido encontrado en varias especies fuera de los mamíferos, incluyendo bacterias, hongos, insectos, invertebrados y plantas en las que dos moléculas de glucosa están unidas con un enlace glucosídico. Se ha visto que induce la autofagia de manera independiente a m-TOR (Sarkar y cols., 2007).*

Compuestos	Diana	Efectos	Referencia
Rapamicina, CCI-779, glucosa, glucosa-6-fosfato	Inhibe la diana de rapamicina (mTOR)	Aumenta la eliminación de la huntingtina mutante, α -sinucleína, tau, ataxina 3 en: células, moscas y ratones transgénicos	(Ravikumar y cols., 2003; Webb y cols., 2003; Ravikumar y Rubinsztein, 2004)
Litio, L-690,330	Inhibe Inositol monofosfatasa, baja niveles de IP ₃	Aumenta la eliminación de la huntingtina mutante y α -sinucleína; cultivos y moscas modelos de EH	(Sarkar y cols., 2005; Fornai y cols., 2008; Sarkar y cols., 2008)
Trehalosa	Independiente de m-TOR	Aumenta la eliminación de huntingtina y α -sinucleína; cultivos y moscas con EH	(Tanaka y cols., 2004; Sarkar y cols., 2007)
Loperamida, nifedipina, Amiodarona	Bloqueante de canales de Ca ²⁺	Reduce los agregados de poliQ; en cultivos	(Zhang y cols., 2007)
Fluspirilina, trifluorperacina	Antagonista dopaminérgico	Reduce los agregados en células	(Zhang y cols., 2007)
Penitrem A	Inhibe la alta conductancia de Ca ²⁺ activada por canales de K ⁺	Reduce los agregados de poliQ; en cultivos	(Zhang y cols., 2007)

Tabla 8. Moléculas inductoras de la autofagia y sus efectos en enfermedades neurodegenerativas, modificado de (Sarkar y cols., 2008).

3.3 La trehalosa como candidato a compuesto neuroprotector en proteinopatías

La trehalosa fue descubierta en 1832 aislada de setas por Wiggers (Wiggers, 1832), en 1859 Berthelot la aisló y nombró tras conseguirla de una sustancia segregada por escarabajos ("trehala manna").

Se la implica en la *anhidrobiosis*, habilidad de animales y plantas de soportar largos periodos de desecación debido a su alta capacidad de retención de agua. Este azúcar forma un gel en las fases de deshidratación conservando y manteniendo en su posición las estructuras, lo que previene de la degradación de los orgánulos (Paiva y Panek, 1996). La posterior rehidratación permite la recuperación de las funciones celulares tras la sustitución de la fase gelatinosa por agua. Además la trehalosa se ha mostrado como un agente antioxidante (Simola y cols., 2000; Benaroudj y cols., 2001), se le atribuyen capacidades de plegamiento de proteínas mediante interacción directa (Singer y Lindquist, 1998); (Welch y Brown, 1996) y la ya mencionada

inducción de procesos de autofagia. Estas características hicieron que se testara como agente protector en agregación de proteínas. La trehalosa ha demostrado ser efectiva al prevenir la formación de agregados de huntingtina y α -sinucleína (Tanaka y cols., 2004; Sarkar y cols., 2007) e inhibiendo la agregación de la proteína β -amiloide y proteínas priónicas reduciendo su citotoxicidad (Liu y cols., 2005a; Beranger y cols., 2008; Izmitli y cols., 2010). La trehalosa muestra características biopreservativas (ya sea de manera directa como indirecta) de proteínas en la naturaleza e industria, además varias investigaciones la apuntan como antioxidante e inductor de autofagia.

En un principio la síntesis de trehalosa era un proceso muy caro, pero a partir de 1994 la empresa japonesa Hayashibara consiguió producir grandes cantidades a bajo coste a partir de almidón y esto le abrió las puertas a su uso en industria aprovechando y descubriendo sus capacidades. Otro punto a su favor como tratamiento es su ausencia de efectos secundarios, tras años de utilización y pruebas meticulosas en la industria alimentaria se sabe que no tiene efectos perjudiciales incluso consumida en grandes cantidades. Por ello se considera la trehalosa como una interesante posibilidad en el tratamiento de este tipo de enfermedades crónicas, o en la previa administración de pacientes con posible disponibilidad a padecerlas. En este trabajo estudiamos el efecto de la trehalosa como neuroprotector sobre la toxicidad de un proceso agudo de anestesia en un modelo de enfermedad de Alzheimer (APP_{swe}, Tg2576).

III- OBJETIVOS

OBJETIVOS

- 1) Estudiar el efecto de la ausencia parcial y total de parkina en un modelo *in vivo* de Alzheimer (APP_{swe}) de patología amiloide en ratones dobles transgénicos APP_{swe}/PK^{+/-} y APP_{swe}/PK^{-/-}.
- 2) Comprobar mecanismos de respuesta desencadenados por la ausencia parcial y total de parkina en la biología, bioquímica, histología y comportamiento en los ratones dobles mutantes APP_{swe}/PK^{+/-} y APP_{swe}/PK^{-/-}. En desarrollos tempranos y avanzados de la enfermedad.
- 3) Estudiar el efecto de la anestesia como factor agravante en la patología Alzheimer, en el modelo murino APP_{swe}, con una exposición crónica a isoflurano.
- 4) Probar la validez de un modelo agudo de anestesia con isoflurano, estudiando las respuestas moleculares, bioquímicas y conductuales en el ratón modelo de Alzheimer APP_{swe}.
- 5) Testar la trehalosa como elemento de neuroprotección ante la toxicidad inducida por isoflurano en el modelo agudo de anestesia en los ratones APP_{swe}.

IV- MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIALES Y REACTIVOS

Anticuerpos:

Anticuerpo anti- β -amiloide 6E10(1-16), monoclonal de ratón	ATOM	1:1000
Anticuerpo anti- β -amiloide (1-42), policlonal de conejo	ABCAM	1:800
Anticuerpo anti- β -amiloide (1-40), monoclonal de ratón	MBL	1:1000
Anticuerpo anti- precursor β -amiloide, policlonal de conejo	ABCAM	1:1000
Anticuerpo anti- Beclin-1, policlonal de conejo	SIGMA	1:700
Anticuerpo anti- β -actina, monoclonal de ratón	SIGMA	1:5000
Anticuerpo anti- β - tubulina, policlonal de conejo	COVANCE	WB: 1:5000 IHQ: 1:500
Anticuerpo anti- Bax, policlonal de conejo	SANTACRUZ	1:750
Anticuerpo anti- Bcl-2, monoclonal de rata	SANTACRUZ	1:500
Anticuerpo anti- CHIP, policlonal de conejo	ABCAM	1:750
Anticuerpo anti- GFAP (Proteína ácida fibrilar de glía), monoclonal de ratón	CHEMICON	1:5000
Anticuerpo anti- GFAP (Proteína ácida fibrilar de glía), policlonal de conejo	DAKO	1:500
Anticuerpo anti- HSP-70, monoclonal de ratón	SANTACRUZ	1:750
Anticuerpo anti- OX6, monoclonal de ratón	SEROTEC	1:500
Anticuerpo anti- p62, policlonal de cabra	SANTACRUZ	1:1000
Anticuerpo anti- parkin (PRK8), monoclonal de ratón	ABCAM	1:400
Anticuerpo anti- PARP, policlonal de conejo	CELL SIGNALING	1:2000
Anticuerpo anti- tau-5, monoclonal de ratón	CHEMICON	WB: 1:5000 IHQ: 1:100
Anticuerpo anti- tau fosforilada (Serina199 + Serina202), policlonal de conejo	ABCAM	1:800
Anticuerpo IgG Alexa Fluor de ratón	MOLECULAR PROBES	1:500
Anticuerpo secundario anti- conejo conjugado con HRP	AMERSHAM	1:1000

Anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina	SIGMA	1:3000
---	-------	--------

Reactivos para Western Blot:

Acrilamida/ Bisacrilamida	BIORAD
Albúmina	SIGMA
Azul de Bromofenol	SIGMA
Azida sódica	SIGMA
β -mercaptoetanol	MERCK
Glicerol	SIGMA
Glicina	SIGMA
Leche en polvo desnatada	Central Lechera Asturiana
Membranas de nitrocelulosa	AMERSHAM
Metanol	MERCK
NaCl	MERCK
Persulfato amónico (PSA)	SIGMA
Rojo Ponceau	MERCK
SDS	MERCK
TEMED	SIGMA
Trizma Base	SIGMA
Tween-20	BIORAD

Reactivos para inmunohistoquímica:

Hematoxilina de Carazzi	MERCK
Diaminobenzidina (DAB)	DAKO

Eosina	MERCK
Ácido periódico	MERCK
Yoduro de plata	MERCK
Cloruro de oro	MERCK
Tiosulfato sódico	MERCK
Violeta de cresilo	MERCK
Rojo nuclear	MERCK
Rojo Congo	MERCK
Ácido acético glacial	PANREAC
Etanol absoluto	MERCK
Glutaraldehído	MERCK
Hoescht 33342 (bisbenzimidazoles)	SIGMA
Kit Streptavidina-ABC	DAKO
Kit TUNEL	PROMEGA
Paraformaldehído	MERCK
Tritón x-100	SIGMA

Reactivos de Biología Molecular

Agarosa	SIGMA
AMV transcriptasa reversa	ROCHE
Bromuro de Etidio	MERCK
Cloroformo	MERCK
ISOPROPANOL	MERCK
Phenol:Cloroformo:alcohol isoamílico	SIGMA

Protector RNase inhibitor	ROCHE
Proteinasa K	ROCHE
SyBR Green	BIO-RAD
Taq Polymerasa	BIOTOOLS
TRIZOL reagent	INVITROGEN

Otros reactivos

2-vinilpiridina	SIGMA
Ácido amino-oxiacético	SIGMA
Ácido ascórbico	SIGMA
Acido homovanílico	SIGMA
Ácido nitrobenzónico	SIGMA
Glutation oxidado	SIGMA
Glutation reducido	SIGMA
Glutation reductasa	ROCHE
Glutation peroxidada	SIGMA
Guanidina	SIGMA
Lactato deshidrogenasa	Glutation peroxidasa

1. ANIMALES UTILIZADOS

Los experimentos fueron llevados a cabo con ratones hermanos de las mismas camadas generados por cruces, para la obtención de un mismo fondo genético para cada uno de los experimentos, como se describirá a continuación. Los animales fueron mantenidos en números similares en los distintos grupos de trabajo y en condiciones adecuadas para minimizar el estrés. Los ratones se mantienen a temperatura y humedad controlada, con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 h estipulados en el estabulario. Toda la manipulación de los animales se hizo de acuerdo con las directrices de la Unión Europea. Nos esforzamos en usar el menor número de animales posible y en minimizar su sufrimiento.

1.1 Obtención y cruce

a) Anestesia crónica y aguda

La línea comúnmente conocida como Tg2576 (B6;SJL-Tg(APP_{SWE})2576Kha) es una línea de ratones transgénicos que sobreexpresan la proteína humana mutada APP695 precursora de amiloide, la isoforma 695 hAPP con la doble mutación sueca-K670N/M671L (Lys670 → Asp; Met671 → Leu) bajo el control de un prion promotor de hámster para su expresión preferencial. Dicha mutación se encontró en una familia sueca con Alzheimer familiar, y usando esta mutación se creó la línea de ratones APP_{swe} para trabajar con un modelo animal de Alzheimer familiar (Hsiao y cols., 1996). Los ratones fundadores de nuestra colonia APP_{swe} fueron generosamente donados por la Dr. Eva Carro del Departamento de Neurología del Hospital "12 de Octubre". Este modelo muestra acumulación de β -amiloide dependiente de la edad, al año los ratones APP_{swe} muestran elevados niveles de A β 1-40, la forma mayoritaria de amiloide en cerebro. De 8 a 16 meses desarrollan placas maduras. Para obtener fondos genéticos comparables en todos los animales de experimentación, los cruces para la obtención de los grupos de trabajo se obtuvieron siguiendo el siguiente esquema (en paréntesis % esperados / obtenidos):

♂ APP_{swe} x ♀ WT → (50 % / 52.2 %) APP_{swe}; (50 % / 47.7 %) WT

En el estudio del impacto del Isoflurano como anestésico crónico se utilizaron machos de 7 meses de edad, de doce a veinticuatro ratones de cada uno de los grupos para los experimentos de conducta y fueron sacrificados a los 10 meses de edad, para análisis bioquímicos e histológicos. Los animales se repartieron al inicio del experimento en 4 grupos: WT control, WT Anestesia, APP_{swe} control y APP_{swe} Anestesia.

Para el estudio del Isoflurano en exposición aguda y la trehalosa como neuroprotector de sus efectos, se utilizaron hembras de 10 meses hasta su sacrificio a los 10.5 meses de edad para análisis bioquímicos e histológicos, se usaron diez ratones por grupo de estudio. Los animales se dividieron en 6 grupos experimentales: WT control, WT Anestesia, WT Trehalosa+Anestesia, APP_{swe} control, APP_{swe} Anestesia y APP_{swe} Trehalosa+Anestesia.

b) Supresión de Parkina en APP_{swe}

Los ratones controles (WT) y los mutantes nulos para el gen Park-2 (PK-/-) son mezcla de C57BL6/129SV (Itier et al. 2003). Los ratones nulos para el gen de la parkina fueron generados por los laboratorios de Aventis Pharma S.A. (Vitry- sur- Seine, France) mediante la delección de un fragmento de ADN de 12 Kb que corresponde al exón 3 del gen Park-2 del ratón. Para ello, se creó un vector portador de la delección del exón 3 y parte del intrón 4 con una resistencia a neomicina (Fig. 9A). Mediante recombinación genética se produce la delección que se confirmó por Southern blot (Fig. 9B). Usando técnicas de Northern blot, se confirmó que el ARN mensajero correspondiente a la parkina desaparece en el ratón mutante de manera que usando los exones 2, 3 y 4 del gen Park-2 para hacer una comprobación, vemos que desaparece la banda correspondiente al exón 3 (Fig. 9C). La consecuencia de esta delección es que se produce un cambio de la pauta abierta de lectura a nivel del codón 57 y aparece una señal de parada en la posición 105. Mediante técnicas de Western blot, usando un anticuerpo anti-parkina, vemos que la banda correspondiente a la proteína parkina ha desaparecido (Fig. 9D).

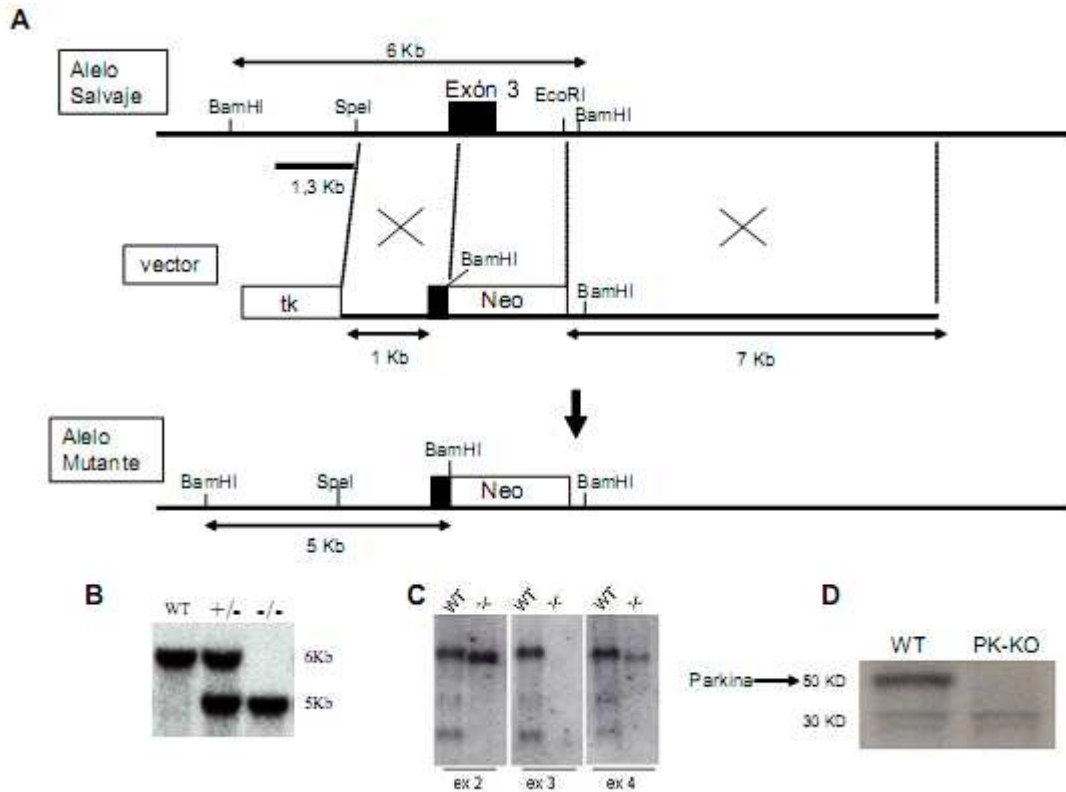


Figura 9. Inactivación del gen Park- 2. A) Estrategia para inactivar el gen que codifica para la proteína parkina en el ratón. B) Southern blot de ADN genómico procedente de ratones salvajes (WT) y mutantes para el gen de la parkina (PK^{-/-}). C) Northern blot: ARN total del cerebro de ratones WT y PK^{-/-}. D) Demostración de la ausencia de la proteína parkina por Western blot.

Utilizando las líneas PK^{-/-} y APP_{swe} se hicieron cruces para la obtención de animales heterocigotos para parkina **APP/PK^{+/-}**:

$$\begin{aligned} \text{♂ APP} \times \text{♀ PK}^{-/-} &\rightarrow (50\% / 53.4\%) \text{ APP/PK}^{+/-}; (50\% / 46.6\%) \text{ PK}^{+/-} \\ \text{♂ APP} \times \text{♀ WT} &\rightarrow (50\% / 52.2\%) \text{ APP}; (50\% / 47.7\%) \text{ WT} \end{aligned}$$

Fruto de estos cruces se obtuvieron animales heterocigotos, estos a su vez se cruzaron para la obtención de los animales APP_{swe} homocigotos para la proteína parkina **APP_{swe}/PK^{-/-}**:

$$\begin{aligned} \text{♂ APP}_{\text{swe}}/\text{PK}^{+/-} \times \text{♀ APP}_{\text{swe}}/\text{PK}^{+/-} &\rightarrow \text{WT} (6.25\% / 10.34\%); \text{APP}_{\text{swe}} \\ &(18.75\% / 13.8\%); \text{APP/PK}^{+/-} (37.5\% / 31.0\%); \text{APP}_{\text{swe}}/\text{PK}^{-/-} (18.75\% / 20.68\%); \\ &\text{PK}^{+/-} 12.5/20.68); \text{PK}^{-/-} (6.25\% / 3.44\%) \end{aligned}$$

Ochenta ratones macho se usaron para los diferentes experimentos de comportamiento; 48 animales para bioquímica y 32 más para los estudios histológicos. Los animales fueron sacrificados a los 12 meses de edad, otro grupo de 24 ratones se sacrificó a los 16 meses de edad y fueron usados para estudios histológicos.

1.2. Genotipado de ratones

a) Genotipado

El genotipo de cada ratón se confirmó por técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y cada ratón se controló a lo largo del experimento mediante microchip. Para extraer el ADN, se cortó un trozo de cola de un centímetro aproximadamente, se troceó y se aisló el ADN mediante un kit de aislamiento de ácidos nucleicos para PCR (Roche, España) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. A continuación se centrifugó 5 min a 12.000 rpm y se recogió el sobrenadante. La concentración de ADN se midió utilizando un NanoDrop® Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware USA).

La mezcla de reacción para la PCR se pusieron los componentes necesarios para que tenga lugar la reacción enzimática de amplificación del ADN: buffer para la reacción, cloruro de magnesio (25 mM), dNTPs (10 mM), primers, Taq ADN polimerasa (PROMEGA, España) y el ADN que queremos amplificar junto con los siguientes *primers* (cebadores) para el análisis del genotipo APP:

PrP antisentido: 5'-GTGGATACCCCCTCCCCCAGCCTAGACC-3',

PrP sentido: 5'-CCTCTTTGTGACTATGTGGACTGATGTCGG-3',

APP sentido: 5'-CCGAGATCTCTGAAGTGAAGATGGATG-3'.

Las condiciones del termociclador para realizar la PCR fueron: Desnaturalización del ADN durante 3 minutos a 94 °C, 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C hibridando durante 1 minuto a 63 °C y 1 minuto de extensión a 72 °C; finalmente, 5 minutos a 72 °C manteniendo el producto de la amplificación a 4

°C. Los productos obtenidos fruto de esta reacción se analizan en un gel de agarosa 1,8 %, con bromuro de etidio, para la visualización de las bandas de ADN. Se usaron marcadores de peso molecular para la estimación de los pares de bases (Roche). Las muestras positivas para la forma mutada de APPh generaron una banda de 400 pb (pares de bases) solo presente en aquellos ratones con el inserto APP humano (Figura 10). Se obtiene también otro fragmento de 750pb que representan un segmento de gen PrP, presente también en los ratones WT, usado como control positivo de la calidad del ADN.

Los *primers* que utilizamos para confirmar la delección del gen de la parkina fueron PK1F, PK2F y PKR:

PK1F sentido: 5'- TGCTCTGGGGTTCGT C -3',

PK2F sentido: 5'- TTGTTTTGCCAAGTTCTAAT -3',

PKR antisentido: 5'- TCCACTGGCAGAGTAAATGT -3'.

Se hicieron dos PCR distintas, una de ellas cargando los primers PK1F y PKR para la obtención de la banda de WT y la otra cargando PK2F y PKR para la obtención de la banda correspondiente de parkina. Las condiciones del termociclador para realizar la PCR son: 3 minutos a 94 °C, 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 53 °C y 1 minuto a 72 °C; finalmente, 5 minutos a 72 °C y mantenemos el producto de la amplificación a 4 °C. Los productos obtenidos fruto de esta reacción se analizan en un gel de agarosa con las condiciones anteriormente mencionadas. Se obtienen fragmentos de 285pb en el caso de la PCR de parkina y 297 para la PCR de WT (Figura 10). En caso de ausentarse la banda de WT indicaría homocigosis para genotipo parkin, dando positivo en la PCR de parkin (PK-/-). Si este producto aparece (a 297 bp), y en la PCR de parkin tenemos producto a 285bp el ratón es heterocigoto para parkin (PK+/-), de no haber producto de la PCR parkin sería WT (Figura 10).

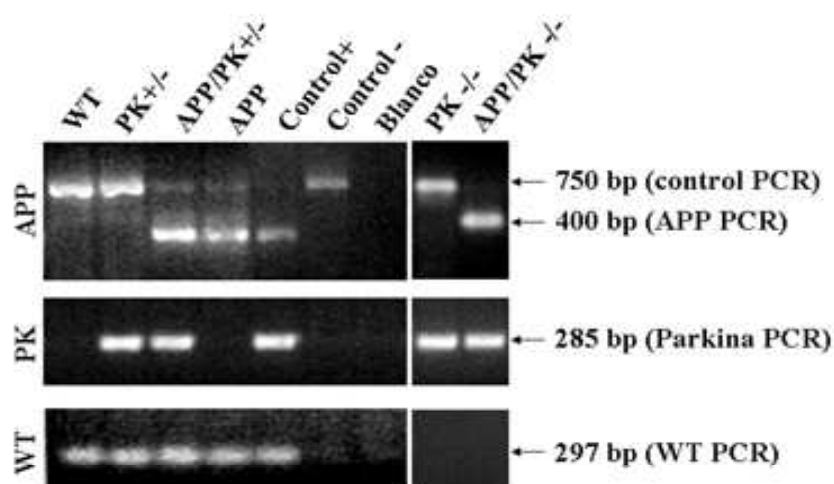


Figura 10. Ejemplos de PCR con los productos de cada reacción y sus genotipos correspondientes.

b) PCR cuantitativa a tiempo real

La cantidad de copias del transgen APP_{swe} en los ratones APP y APP/PK+/- se midieron utilizando el método de SybrGreen™ qPCR (Bio-Rad, Hercules, CA) en un detector iCycler (Bio-Rad). Se usó un fragmento del gen de albumina murina como control interno. Las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado con 25 ng de DNA de las muestras, 1.5 μM de los primers (o cebadores) específicos para cada gen, y mezcla de reacción (1xPCR master mix de Bio-Rad), en un volumen final de 25 μl. Los primers se diseñaron utilizando PrimerBank (Wang and Seed 2003) y la qPCR se llevó a cabo en un termociclador iCycler de BIO-RAD. Las condiciones de la qPCR usadas para todos los primers fueron: 95 °C 10 min, 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos y 59°C 1 minuto. La fluorescencia emitida por el SybrGreen™ se midió durante la fase de anillamiento y extensión, y las gráficas se generaron mediante el Sequence Detection System (BIO-RAD). Los primers utilizados fueron (en sentido 5'→3'):

- Transgen APP (sentido): preA4a: 5'-GTTCTGGGTTGACAAATATCAAG-3'
- Transgen APP (antisentido): preA4b: 5'-ATGATGAACTTCATATCCTGAG-3'
- Albúmina murina (sentido): Albrat1: 5'-CCAAGATTGGATTTAAGGACC-3'
- Albúmina murina (antisentido): Albrat2: 5'-GATGCAGTGCACAACATCTC-3'

2. PROCESO ANESTÉSICO

2.1 Anestesia crónica

El procedimiento anestésico usado con los ratones macho WT y APP se diseñó para emular concentraciones quirúrgicas en operaciones rutinarias, Isoflurano 4 % para la inducción del sueño (aproximadamente 1 minuto) y 2 % de isoflurano como dosis de mantenimiento (hasta el final de la exposición), con 2 intervenciones semanales. No se utilizaron relajantes musculares, ni óxido nitroso, el vehículo de la molécula anestésica fue oxígeno 100%. Los animales se sometieron a este tratamiento durante 3 meses, desde los 7 hasta los 10 meses de edad. La duración de las intervenciones se ajustó al inicio del experimento, desde los 30 a los 20 minutos, con un flujo de 1L/min, por motivos de hipersensibilidad del grupo APP_{swe} vs WT frente a exposiciones más largas de isoflurano (4 muertes de ratones APP con los primeros experimentos de 30 minutos de isoflurano, uno más con la exposición de 20 minutos).

Se controló la temperatura corporal cutánea de los ratones antes y después de la anestesia, mediante un termómetro de infrarrojos (se realizaron 3 medidas) y se utilizó una manta térmica en la caja de anestesia para reducir la pérdida de temperatura durante el proceso ($\pm 0.21^{\circ}\text{C}$).

Al finalizar la anestesia se colocan los ratones en sus respectivas jaulas, en ellas mediante video-filmación se controla el tiempo de educación. Se valoraron parámetros como recuperación del reflejo refractario e inicio de actividad exploratoria y motriz frente a estimulación corporal (levantamiento de la parte posterior del cuerpo). Los ratones de los grupos controles, sin anestesia de ambos genotipos (APP_{swe} y WT) se colocaron en la caja de anestesia durante 20 minutos con flujo de oxígeno. Se sacrificaron a los animales 24 horas tras la última sesión, mediante dislocación cervical.

2.2 Anestesia aguda

El procedimiento anestésico se diseñó con la idea de realizar dos únicas exposiciones, durante más tiempo (1 hora y media) y disminuyendo la concentración de Isoflurano (1 %) y el número de tratamientos (2 veces por semana). Los animales se sometieron a este proceso a la edad de diez meses, tras la última administración se esperaron 24 horas para su sacrificio. Se

controló la temperatura corporal cutánea de los ratones en cuatro medidas: temperatura previa, a los 30 minutos y 60 minutos aproximadamente y después de la anestesia, mediante un termómetro de infrarrojos (3 medidas en cada ocasión). Dependiendo de estas medidas se utilizó una manta térmica en la caja de anestesia para minimizar la pérdida de temperatura durante el proceso.

En este diseño fue necesario alojar a los ratones en una caja de metacrilato con salida de gases y elevar mediante un alza a los ratones sobre el suelo del compartimento para contrarrestar los posibles efectos tóxicos de acumulación del isoflurano (gas más pesado que el aire), debido al mayor tiempo de exposición.

2.3 Estudio de variables respiratorias y cardiovasculares durante la anestesia

a) Electrocardiograma

La monitorización del ritmo respiratorio se realizó sobre 5 ratones (machos y hembras) de cada genotipo en cada experimento (anestesia crónica y aguda). Los animales se anestesiaron con el proceso descrito anteriormente, el electrocardiograma se obtuvo con la colocación subcutánea de dos agujas hipodérmicas en las patas delanteras y traseras al animal. Los electrodos se conectaron a un amplificador diferencial de señal (Tektronix, 26A2).

El electrocardiograma fue grabado durante un minuto, a los 10, 20 y 30 minutos. La señal se digitalizó a 5kHz usando una Digidata 1200 (Axon Instruments), almacenada y analizada posteriormente en un ordenador usando el programa Axotape (Axon instruments).

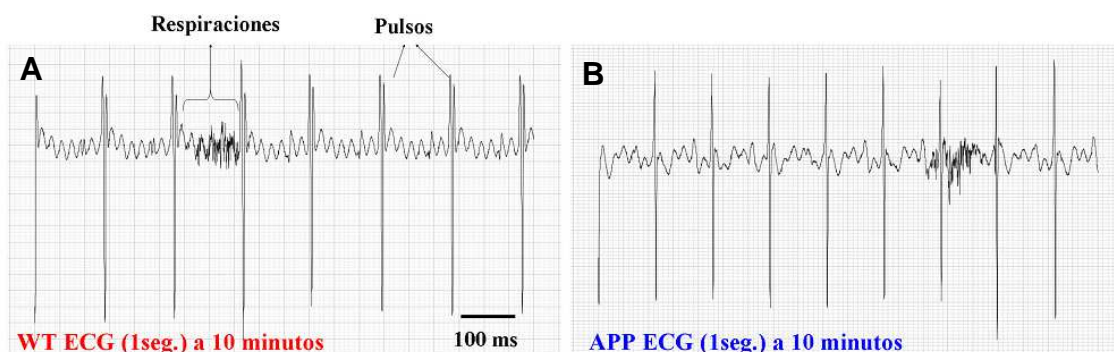


Figura 11. Un minuto de electrocardiograma en WT A) y APP B). Además del ritmo cardiaco (pulsos) se observa la actividad eléctrica muscular en los procesos respiratorios.

b) Monitorización de variables cardiovasculares

Para la medida de las variables cardiovasculares se anestesió al animal con el procedimiento de cada modelo de experimentación y se estabilizó la temperatura corporal mediante un termómetro rectal conectado a una alfombrilla eléctrica (Panlab, España) situada debajo del animal (recubierta de tela para evitar quemaduras). La saturación parcial de oxígeno en sangre se analizó mediante un pinzamiento en la zona postcefálica del ratón con una pinza de infrarrojos (Starr laboratory, EEUU) y analizada mediante el programa "Blood-Ox" (Panlab, España). Se midieron temperatura, pulso y presión arterial mediante un pinzamiento en la base de la cola. Para la medición de la presión arterial (sístole, diástole y media) se aumentó artificialmente la temperatura del ratón de 0.5 a 1°C para conseguir vasodilatación. Una vez estabilizada la señal se tomaron 3 medidas y se hizo la media con el NIBP ("Non Invasive Blood Pressure", Starr laboratory).

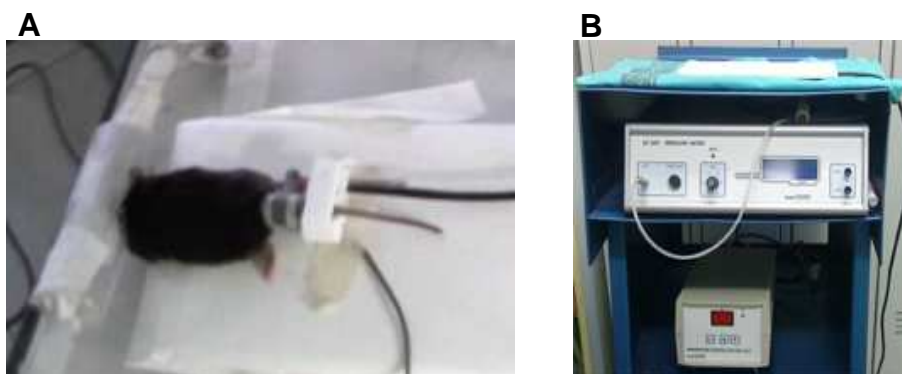


Figura 12. A) Ratón anestesiado conectado al NIBP, pinza en la cola (medición de pulso, presión arterial) y termómetro rectal en el diseño experimental. B) Parte superior dispositivo de control de la presión arterial y el pulso, debajo dispositivo de análisis de la temperatura y control de la manta térmica.

3. ESTUDIOS DE CONDUCTA

3.1 Actividad motora

Se cuantificó la actividad motora de los animales durante 10 minutos (después de 10 minutos de adaptación). Para ello se utilizó un monitor de actividad motora (Actitrack LE 8811 V. 20/01/04, Panlab S.L.) consistente en

un campo abierto (22.5 x 22.5 cm), con dos marcos provistos de 16 bandas de infrarrojos en cada eje en forma de rejilla, de forma que se puede determinar la actividad motora analizando la posición y la frecuencia con la que los sujetos cortan las células infrarrojas. Cada barrera tiene un emisor y un receptor de infrarrojos, y su información se transmite a un ordenador, pudiendo analizar distintos parámetros de comportamiento como: distancia recorrida; velocidad media; tiempo que están moviéndose lentamente (velocidad < 5 cm/s); tiempo de inactividad; actividad exploratoria vertical (rearings), y distribución zonal del movimiento dentro del campo abierto, para valorar ansiedad. En nuestro modelo experimental se analiza la ansiedad ó estrés de los ratones mediante la valoración "zonal". Se divide el campo abierto en dos zonas: externa (rojo) e interna (verde), considerando índice de ansiedad el tiempo en el que el ratón se encuentra en la zona externa.

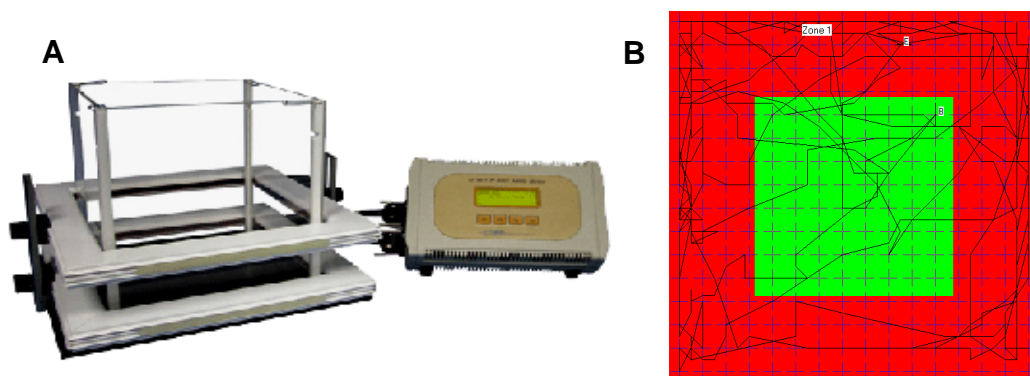


Figura 13. A) Monitor de actividad: Acti-track (Panlab). B) Ejemplo de análisis de recorrido de un ratón, parte externa (rojo) y verde (interna). El % de tiempo de análisis en el que el ratón se encuentra en la parte externa se considera índice de estrés.

3.2 Laberinto en Y

Para el estudio del aprendizaje se usó un laberinto de PVC blanco en forma de Y. Cada brazo tiene 40 cm de largo, 4 cm de ancho y 21 cm de alto, para asegurar un comportamiento no inducido del ratón, el suelo se sustituye para cada ratón con papel de filtro, y la parte baja del laberinto se limpia con alcohol para evitar olores entre animales (Figura 14B). Se analizaron las pruebas realizadas por los ratones tras un periodo de adaptación. Se coloca al ratón en uno de los extremos del laberinto, y se cuantifican cada uno de las exploraciones en los brazos durante 5 minutos. Se considera exploración

cuando el ratón sobrepasa el vértice de unión de los brazos con la parte posterior del cuerpo, sin contar la cola. Estas pruebas se realizaron siempre en la misma franja horaria (de 17:00 a 20:00 pm), por los mismos investigadores, en el mismo lugar y alternando los grupos de análisis con intención de minimizar los errores experimentales.

Se analizaron dos variables: % alternancia entre brazos (como un índice de memoria de trabajo) y el número de exploraciones totales.

La alteración espontánea en las exploraciones, se usó para el análisis de la memoria a corto plazo, actividad motora y la ansiedad. Se midió el cociente entre las alteraciones espontáneas (número de entradas del ratón en los 3 brazos sin repetir) / número de alteraciones posibles (número de entradas totales – 2) x 100 para hacerlo porcentaje (Mouri et al. 2007). El número de entradas totales realizadas por el ratón se consideró un índice de actividad exploratoria y ansiedad del ratón.

$$\% Alternancia = \left(\frac{\text{núm. variaciones}}{\text{entradas.totales} - 2} \right) \times 100$$

3.3 Rota-rod

La coordinación motora se determinó utilizando un Rota Rod (LE 8200, PanLab S.L.) (Figura 14A). El Rota Rod consiste en un tambor con un eje central estriado (para que el animal pueda sujetarse) de 25 mm de diámetro, y dividido en secciones (una por animal). Este tambor rota a una velocidad constante o acelerada, y el tiempo que el ratón es capaz de permanecer sobre el tambor es índice de su coordinación motora. Cuando el ratón cae, activa una palanca que tiene un detector conectado a un ordenador que registra el tiempo en el que cada ratón cae.

En nuestro diseño experimental, se acostumbró a los animales a permanecer en el tambor parados y a la mínima velocidad (4 r.p.m.), y después se les sometió a 3 protocolos de aceleración constante de 4 a 40 r.p.m., registrando la aceleración y tiempo en el que caían los animales cada vez, calculando la media para cada ratón.

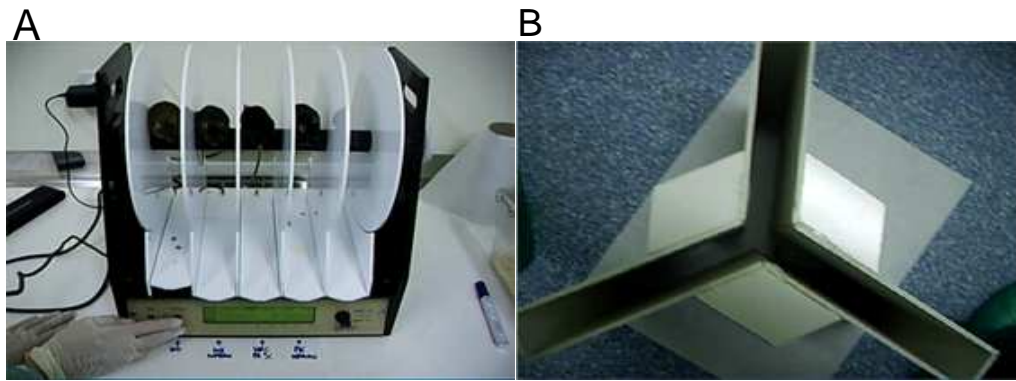


Figura 14. Fotografías de A) Rota-rod y B) Laberinto en Y durante un experimento.

3.4 Estudio de zancada

La disminución de la longitud de la zancada es uno de los síntomas típicos de la enfermedad de Parkinson, por eso se diseñó un método sencillo para medirla en nuestro modelo de ratones (Figura 15). Consta de un corredor iluminado de 7 cm de ancho por 60 cm de largo, terminado en una caja oscura, colocado sobre un papel intercambiable. Se tiñeron con tinta para tatuaje animal las extremidades y se colocó al ratón en el extremo iluminado. Este tiende a ir hacia la caja oscura, dejando sus huellas tintadas en el papel, pudiendo medirse posteriormente la longitud de la zancada de cada ratón con una regla milimetrada.

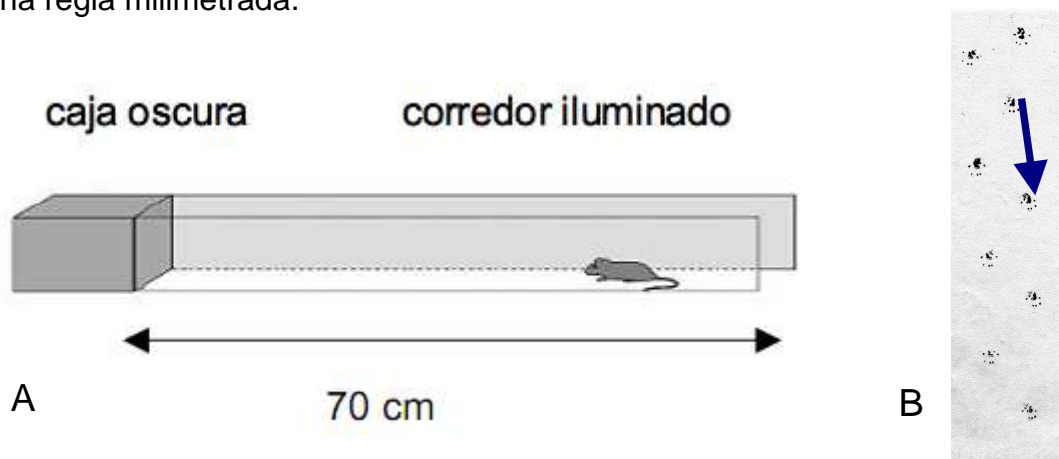


Figura 15. Esquema de experimento para la medición de zancada. A) Diseño, B) resultado.

4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDO CEREBRAL

Los animales para el estudio se sacrificaron mediante distensión cervical, el cerebro se extrajo sobre una placa patri con hielo y posteriormente se separaron los hemiserebros mediante un corte longitudinal. El hemisferio izquierdo fue congelado en hielo seco y posteriormente conservado a -80°C , para de análisis bioquímicos (ensayos de ELISA y WB); el derecho sumergido en PFA 4% durante 2-3 días y posteriormente incluido en parafina para análisis histológicos.

El hemiserebro izquierdo se pesó y se homogenizó en frío con un homogenizador mecánico de teflón en 4 volúmenes (peso/volumen) de PBS (tampón fosfato salino, Invitrogen) con un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Calbiochem). De este homogenizado se hicieron dos fracciones, a una de ellas se añadió buffer de guanidina (Guanidina HCl 6M en Tris HCl 6mM, pH 8.2) hasta alcanzar una concentración final de guanidina 5M. Se agitaron durante 3 horas a temperatura ambiente y posteriormente se alícuotaron para la determinación de proteínas por WB y el análisis mediante ELISA de la fracción total de β -amiloide; la otra fracción se centrifugó a $1700 \times g$ durante 15 minutos y el sobrenadante se utilizó para la cuantificación de la fracción soluble de β -amiloide, y análisis de proteínas por Western blot.

La fracción de guanidina también se utilizó para WB para la determinación de las proteínas: P-Tau y β -amiloide, tras precipitar la guanidina restante en la muestra mediante metanol. Se añadió a la muestra de guanidina, metanol en proporción 8 a 1, se mezcló mediante vórtex y baño de ultrasonidos y se dejó toda la noche a -20°C . Se centrifugó la muestra 30 minutos a 4°C y 10000 rpm y se decantó el sobrenadante conservando el pellet de las muestras. El pellet se resuspendió en buffer bicarbonato con inhibidores de proteasas y se sonizó (VibraCell, 30 segundos al 2) añadiendo tampón de carga (véase electroforesis posteriormente) en proporción 1 a 1 para utilizarse en WB.

5. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Tras la fijación del cerebro en una solución de paraformaldehído al 4 % en solución salina durante 2-3 días, el tejido fue incluido manualmente en parafina y cortado de manera seriada en secciones de un grosor entre 3 y 6 micras. Finalmente los cortes se recogieron sobre portas tratados con poly-D-Lysina.

5.1 Inmunohistoquímica

Para las tinciones inmunohistoquímicas se utilizaron anticuerpos primarios anti-tau total (tau-5) y anti-tau fosforilada (AT-8 y AT-100) para el marcaje de ovillos y acumulos de tau; anti β -amiloide (1-42) para marcar placas seniles y anti-GFAP para marcar reactividad astrogliar.

Como contraste se usó la tinción haematoxilina de Carazzi en las tinciones inmunohistoquímicas en las que se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con HRP (Peroxidasa) y reveladas con DAB (diaminobenzidina). Hoescht para marcar los núcleos de las preparaciones en que se utilizó un secundario fluorescente.

5.2 Técnica de TUNEL

La muerte apoptótica se valoró histológicamente mediante la técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick and labeling), que incorpora la fluoresceína-12-dUTP a los extremos 3'-OH del ADN fragmentado de las células apoptóticas, usando la enzima TdT deoxynucleotidyl transferasa (Whiteside et al. 1998). Se utilizó un kit de Promega. Las células apoptóticas se detectaron mediante microscopía de fluorescencia, y se contaron las células positivas (color verde) en todo el corte. Los cortes incubados con el tampón pero sin la enzima TdT, se usaron como controles negativos.

5.3 Estudio de gliosis: astrocitos

La astrogliosis fue evaluada mediante inmunohistoquímica (IHQ) para la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP). Mediante un microscopio invertido de fluorescencia acoplado a una cámara SONY 950C, se captaron 14 campos predeterminados, de la misma forma y todos en la misma sesión, en los hipocampos de todos los grupos experimentales (a un aumento de 20X). Se estudió la astrogliosis al analizar los cortes histológicos en fluorescencia tratados con un anticuerpo específico anti-GFAP, para marcar la extensión de las células astrogliales. Las imágenes fueron procesadas mediante un programa de análisis de imagen (Image-Proplus). De la imagen captada con el microscopio de fluorescencia, mediante el programa de análisis de imagen valoramos el área y la intensidad de la tinción fluorescente. Se determinaron el área y la densidad o intensidad óptica integrada (IOD), que se define como el área por la intensidad óptica.

6. ENSAYOS BIOQUÍMICOS

6.1 Concentración de proteínas

La determinación de la concentración de proteínas se realizó utilizando el método de BCA en la fracción soluble (PBS + inhibidores) y fracción total (PBS + guanidina) del homogenizado del tejido cerebral. El ensayo de BCA combina el principio de la reducción por parte de las proteínas de ión Cu^{+2} a ión Cu^{+1} en presencia de medio alcalino (reacción de Biuret), con la alta sensibilidad de detección colorimétrica de los cationes Cu^{+1} por el ácido bicinchónico (BCA). El producto de la reacción de este ensayo está formado por la interacción de dos moléculas de BCA con una molécula de ión cuproso (Cu^{+1}). Este compuesto presenta absorbancia a una longitud de onda de 562 nm. Se usa siempre una curva patrón con albúmina de suero bovina (BSA) 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ con concentraciones crecientes desde 2.5 a 100 μM . Todas las medidas espectro-fotométricas se realizaron en un lector de placas automático (SpectraFluor, Tecan, Salzburgo, Austria).

6.2 Electroforesis, transferencia e inmunodetección de proteínas

De 20 a 40 µg de proteína preparados en tampón de carga 2X (0.186 M Tris, 0.25 mg/ml azul de bromofenol, 6% β-mercaptoetanol, 15% V/V glicerol y 9% P/V SDS) se sometieron a separación, por peso molecular, mediante electroforesis continua en condiciones desnaturalizantes, en geles de poliacrilamida al 10-15% (SDS-PAGE). Seguidamente, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm mediante electro-transferencia. Antes de comenzar la inmunodetección las membranas se tiñeron con rojo Ponceau al 0.1 % diluido en ácido acético al 5% para comprobar la efectividad de la transferencia.

Para el inmunomarcaje, las membranas se bloquearon con un 5% de leche en polvo o 5% BSA dependiendo del anticuerpo en PBS tween (tampón fosfato y detergente Tween-20 de Bio-Rad al 0.01%), durante una hora a temperatura ambiente, con el fin de evitar uniones inespecíficas. Tras el bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo correspondiente en la solución de bloqueo durante toda la noche y a 4 °C. La membrana se lavó abundantemente con PBS y se incubó durante una hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios anti-IgM de ratón, de conejo, de rata o de cabra conjugados con peroxidasa a una dilución 1:1000 en la solución de bloqueo. Tras el lavado, las bandas inmunorreactivas se visualizaron por el método de Inmuno-Star HRP de Bio-Rad (detección por quimio-luminiscencia), utilizando autorradiografías o el aparato QuantityOne de Bio-Rad con el programa VersaDoc, valorando su intensidad por densitometría.

Los anticuerpos utilizados fueron: Tau-5 (Abcam) para la detección de tau total, AT-8 y P-Tau (Abcam) para tau fosforilada, con una concentración de 1/1000. Anti-cuerpos β-amiloide se usaron: Aβ (1-42) y anti-precursor Aβ de Abcam, Aβ (1-40) de MBL y Aβ 6E10 de Covance, todos ellos diluidos 1/1000. Anti-bax y anti-bcl2 (Santa Cruz) se usaron como marcadores de muerte por apoptosis a 1/400 y anti-chaperona-HSP70 1/2000 (Santa Cruz) y co-chaperona/E3 ubiquitin ligasa anti-CHIP 1/500 de Abcam; p-62 (1/600, Abcam), LC-3 (1/1000, MBL) y Beclina 1 (1/700, Sigma) se utilizaron para detectar procesos de autofagia. Anti-PRK8 (1/400, Abcam) para análisis de expresión de parkina, anti- GFAP (1/5000, Chemicon) para astrogliá, OX-6 (1/1000,

Serotec) para microglía. Para la realización del control de carga proteica la membrana se reincubó con anticuerpos contra la β -actina y β -tubulina (1/10000, Sigma y Covance) revelados con el sistema de fosfatasa alcalina o peroxidasa.

6.3 ELISA para la cuantificación de la fracción soluble y total de β -amiloide

Para la cuantificación de los niveles de A β usamos dos kits de ELISA: β -amiloide humano HS1-42 de Biosource, para la cuantificación de los niveles solubles e INNOTEST 1-42 de Innogenetics para la valoración de los niveles totales (forma soluble más insoluble) de A β . Las muestras fueron procesadas según las instrucciones de los fabricantes de los kits. La fracción total de A β se obtuvo desnaturalizando los agregados insolubles presentes en las muestras. Para ello las muestras se trataron con Tris-HCl 6mM y guanidina 5M (Sigma Aldrich). La fracción total se diluyó 1/50 para introducir los datos en la escala de la curva estándar del ELISA. Los niveles de amiloide soluble, estudiados en la fracción soluble de PBS, se midieron directamente sin diluciones en el ELISA. Una vez la reacción finalizó, el producto final se midió a 450 nm en un lector 680 de BIO-RAD.

6.4 Agregación y caracterización del péptido A β (1-42)

Para determinar los distintos estados de agregación del péptidos β -amiloide se utilizaron técnicas de electroforesis y WB. Como estándar externo se preparó mediante incubación péptidos A β (1-42) (Bachem) en diferentes estados de oligomerización, 20 μ g de péptido disuelto 1 mg / ml en agua estéril a 37 °C durante una semana. Para preservar su estructura se formó una unión reticular aplicando glutaraldehído (Levine 1995) en proporción 1/10, después de 2 minutos de incubación, la base formada entre el aldehído y las aminas se estabilizó con NaBH₄ (10 μ l de 6 mg/ml, en 0.1M NaOH). Después de 10 minutos se añadieron 15 μ l de buffer para WB (sustituyendo glicerol por 20% de sacarosa). Las muestras de tejido cerebral y el estándar externo de A β sin

calentar se cargaron en un gel de acrilamida al 18%, se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa para su detección mediante WB.

6.5 Medición de la actividad proteosomal

Medimos la actividad del proteosoma (UPS) en cerebro. Las muestras de tejido cerebral fueron homogenizadas en tampon de lisis proteosomal (50mM HEPES, pH 7.5, 150mM NaCl, 5mM de MgCl, 0.5 mM DTT (1.4-ditioteridol) y 0.03% de tritón-X100) en hielo usando un poter recubierto de teflón, posteriormente se sonicó en el VibraCell durante 30 segundos a 0.5 de potencia. Los productos lisados se centrifugaron a 12000 x g a 4°C durante 30 minutos. La concentración de proteínas se obtuvo usando la fracción del sobrenadante con el kit BCA de proteínas. La actividad proteosomal se cuantificó con la acumulación del producto fluorescente 7-amino-4-metilcoumarina (AMC) de los sustratos artificiales del proteosoma, las fracciones Suc-Leu-Leu-Val-Tys-AMC. Las fracciones Leu-Arg-AMC y Z-Leu-Leu-Glu-AMC se usaron para valorar las actividades quimiotripsina, tripsina y la hidrólisis del péptido peptidil-glutamato (PGPH) del proteosoma. El ensayo se realizó con 50 µg de lisado de tejido y el sustrato incubados a 37°C durante 190 minutos. La fluorescencia emitida por el AMC se midió a una longitud de onda de 360 nm de excitación y 465 nm de emisión.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los análisis estadísticos se realizaron con el test de ANOVA de 1 o 2 vías, seguido de un post-test de Newman-Keuls o Bonferroni respectivamente, considerando significativas diferencias con $p \leq 0,05$. En los análisis de supervivencia diferencial entre los ratones WT y APP_{swe} sometidos a anestesia crónica se aplicó un test de Log-Rank. Para facilitar el análisis y representación de los datos, se utilizó el programa informático PRISM de GraphPad-Software.

V- RESULTADOS

I. ANULACIÓN PARCIAL Y TOTAL DE LA PROTEÍNA PARKINA EN UN MODELO GENÉTICO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Con el objeto de estudiar la función de la proteína parkina en un modelo de enfermedad de Alzheimer genético se diseñaron 6 grupos experimentales. Se cruzaron ratones knock-out de parkina: PK-KO, con ratones knock-in de APP (transgen de APP humana mutada): APP_{swe} para obtener un ratón con ambas características: transgen APP y expresión parcial de parkina PK^{+/-} (heterozigoto). Posteriormente se completó el modelo doble mutante mediante cruce y selección posterior de animales con expresión de APP y anulación total de la proteína parkina: APP-PK^{-/-} (homozigotos). Se realizaron todos los experimentos comparando con los correspondientes controles: WT, APP_{swe}, PK^{+/-} y PK^{-/-}, con el mismo fondo genético y estabulados juntos, en las mismas condiciones ambientales. Por tanto hemos estudiado, a partir de múltiples cruces de los ratones parkin -/- (PK-KO) y APP_{swe} los siguientes 6 genotipos experimentales: WT, APP_{swe}, APP_{swe}/PK^{+/-}, PK^{+/-}, APP_{swe}/PK^{-/-} y PK^{-/-}.

El objetivo era observar la variación de la patología y fenotipo de EA por la anulación de la parkina en un modelo de ratón doble transgénico. La parkina es una E3 ubiquitin ligasa, muy importante en la vía de eliminación de proteínas anómalas por el proteosoma y la EA es una enfermedad neurodegenerativa con una neurotoxicidad relacionada con la acumulación proteica.

Se realizaron estudios de conducta y comportamiento, muerte celular, análisis histológicos y bioquímicos observando una compensación en los grupos dobles mutantes en todas las características de la EA (conducta, muerte y acumulación de proteínas tau y Aβ). Este sistema de respuesta puede estar relacionado con la compensación por chaperonas, co-chaperonas, autofagia, GSH, entre otros, curiosamente potenciados por la ausencia de la parkina.

Los resultados muestran al contrario de lo previsto que la ausencia de un sistema de neuroprotección, la parkina, se muestra beneficioso en la patología amiloide en ratones APP_{swe}, debido a la compensación de la respuesta por otros sistemas.

1.1 Actividad motora, de exploración, supervivencia y fenotipo clínico en ratones APP y APP/PK

Los 6 grupos de ratones analizados (WT, APP_{SWE}, APP/PK+/-, APP/PK-/- y PK-/-) tuvieron un desarrollo y evolución de peso normal hasta el momento del sacrificio (12 y 16 meses). Los ratones APP_{SWE} ganaron menos peso que el resto de grupos, esta pérdida de peso se revirtió en los ratones dobles mutantes APP/PK (Figura 17A).

Se estudiaron las capacidades físicas de los ratones, la capacidad sensomotora, mediante el rota-rod. No hubo diferencias entre los grupos, en el tiempo de permanencia sobre el rota-rod ni a velocidad constante ni en aceleración (Figura 16A y 16B).

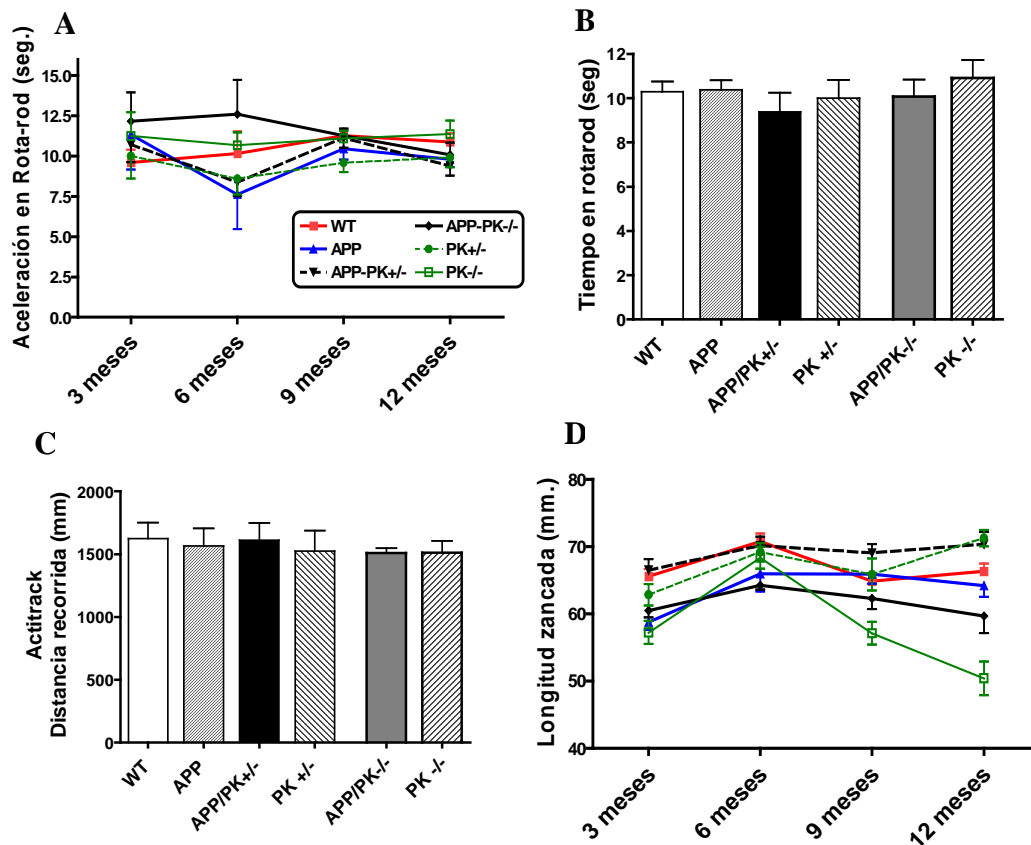


Figura 16. Análisis de la capacidad motora de los ratones. (A) Tiempo de permanencia en la barra del Rota-rod en una prueba con aceleración a los 3, 6, 9 y 12 meses de todos los grupos experimentales, y (B) a los 12 meses de edad. (C) Distancia recorrida en el A-track durante 10 minutos de análisis. (D) Longitud de la zancada a lo largo de todo el estudio en todos los grupos. Los datos se presentan como $\square \pm \text{SEM}$ (n = 10-24).

También se comparó la capacidad de exploración con la distancia recorrida en un campo abierto y la variación de la longitud de la zancada en todos los grupos de análisis (Figuras 16C y 16D).

Una vez confirmada la motricidad normal de los diferentes grupos se analizó el índice ambulatorio (Figura 17C), y se observó una reducción significativa en la permanencia de la zona externa en los ratones APP_{swe} revertida en los dobles mutantes, tanto APP_{swe}/PK+/- como APP_{swe}/PK-/- . Los ratones reaccionan ante estímulos que produzcan miedo o inseguridad manteniéndose en las zonas menos expuestas. Por tanto la permanencia en la zona externa se considera un índice de estrés, y los niveles se recuperan en los grupos APP_{swe}/PK en comparación con el grupo APP_{swe}.

Por otro lado se considera un síntoma de parkinsonismo el acortamiento de la zancada en el desplazamiento, descrito previamente en los ratones PK-KO, como modelo de Parkinson familiar, desde aproximadamente los 6 meses de edad. La longitud de la zancada se redujo significativamente en los knock-out para parkina, tanto PK-/- como APP_{swe}/PK-/- como era de esperar, y en el grupo APP_{swe} respecto los controles WT. Esta diferencia puede ser atribuida al menor tamaño de este grupo o bien a que estos animales presentan parkinsonismo subclínico (Figura 16D y 17B).

Se realizaron experimentos de laberinto en Y con los ratones, con la intención de estudiar su capacidad mnemónica. El número de entradas en el laberinto en Y, considerado un índice de exploración / interés por el medio, (Figura 17D) mostró una mayor reducción en los grupos con genotipo APP (APP, APP/PK+/- y APP/PK-/-). El porcentaje de alteraciones espontáneas completas (explorar los 3 brazos del laberinto sin repetir) se considera un indicador de la memoria en trabajo, calificado como las estructuras y procesos relacionados con la memoria activa y de corto plazo (manipulación y almacenamiento temporal de recuerdos). Los ratones APP_{swe} tuvieron significativamente una menor alternancia en comparación con WT; esta diferencia se revirtió totalmente en los dobles mutantes APP/PK+/- y APP/PK-/- (Figura 17E).

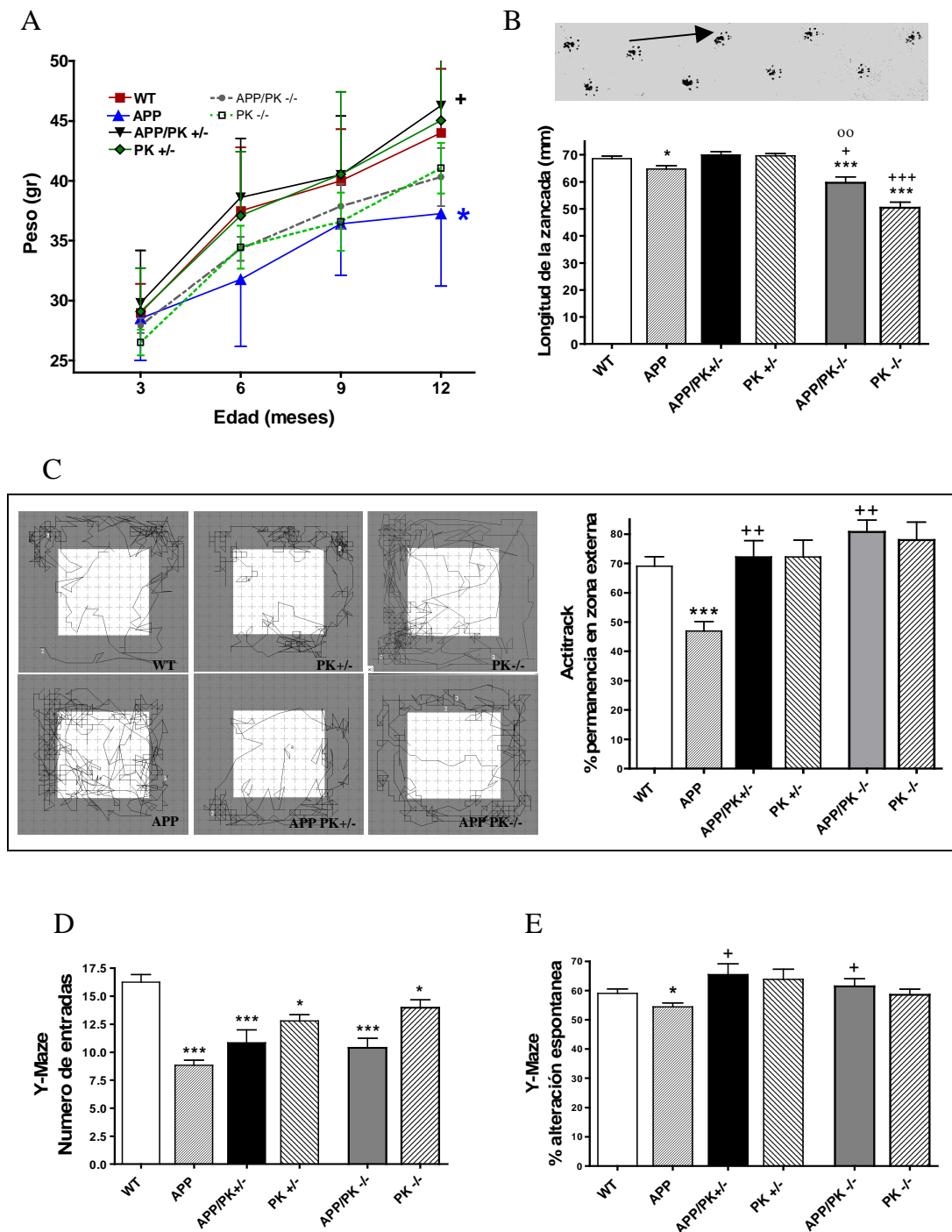


Figura 17. Evolución del peso corporal, exploración y comportamiento motor en los grupos de análisis en machos de 12 meses de edad. (A) Peso a los 3, 6, 9 y 12 meses de edad de los grupos experimentales. Los APP tienen un menor peso revertido en los dobles mutantes APP/PK^{+/+} y APP/PK^{-/-}. (B) Longitud de zancada, reducida en los grupos PK-KO y ligeramente reducida en el APP. (C) Análisis de Acti-track en campo libre durante 10 minutos. (D) y (E) Índices de exploración y menmónico en el laberinto en Y. □ ± SEM (n = 16-33). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido de test "Newman-Keuls". *p<0.05, ***p<0.001 vs WT; +p<0.05 vs APP.

1.2 Producción y acumulación de β -amiloide en ratones APP y APP/PK

En general se acepta como una de las causas de la EA la acumulación de oligómeros de $A\beta$, esta acumulación proviene del corte de la proteína precursora del amiloide, APP. En nuestro modelo (APP_{swe}) se ha introducido como transgen un gen humano de la proteína APP_{swe} mutada, aumentando la acumulación por una mayor producción, depósito y agregación de β -amiloide en el organismo, llevando a un símil de patología EA. El corte de la proteína produce una acumulación de distintos tamaños según estos agregan entre sí, en la actualidad no se tiene claro qué fragmentos son culpables de la toxicidad en EA.

Se usó un anticuerpo anti- β -amiloide (6e10) en Western blot para ver la agregación de la proteína. El fragmento de mayor peso molecular, 80 KDa, se observó sólo en los ratones knock-in del gen humano de APP (en los ratones APP y APP/PK). Los ratones APP_{swe} y $APP_{swe}/PK+/-$ mostraron niveles de este fragmento proteico $A\beta$ similares (Figura 18B y C), mientras que los ratones WT y PK+/- no lo expresaron. El fragmento de bajo peso molecular, a 40 KDa, sí aparece en todos los grupos, que corresponde al amiloide endógeno del ratón (Figura 18A). A 40 KDa se observaron diferencias significativas en aquellos grupos transgénicos APP, en este caso los grupos APP_{swe} y $APP/PK+/-$ tienen mayor depósito de la proteína en comparación con el resto de grupos.

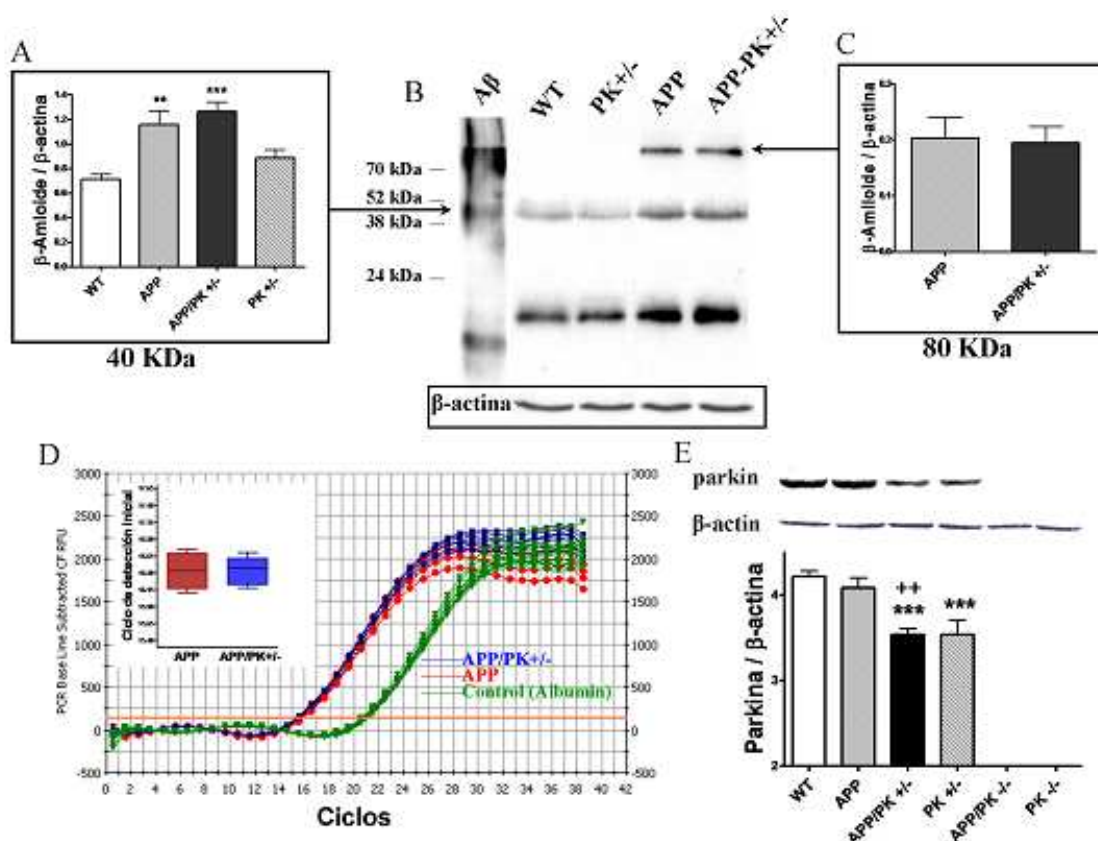


Figura 18. Western Blot con anticuerpos anti-Aβ y PCR cuantitativa para el transgen humano en ratones APP y APP/PK+/- de 12 meses. (A) Cuantificación de la banda Aβ de 40KDa. Se constatan mayores niveles en transgénicos APP y APP/PK+/- . **(B)** WB representativo de los 4 grupos experimentales, junto con un estándar interno de agregados Aβ. **(C)** Cuantificación de la banda exclusiva del transgen humano a 80 KDa. **(D)** PCR cuantitativa a tiempo real con el inserto APP humano comparando grupos transgénicos APP y APP-PK+/- . **(E)** Western Blot de la proteína parkina; se observa una reducción en los grupos heterocigotos para parkina y desaparición en los homocigotos, nulos para parkina. □ ± SEM (A y C: n = 16-33; D y E: n = 6). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido de test "Newman-Keuls". **p<0.01, ***p<0.001 vs WT; ++p<0.01 vs APP.

Con objeto de descartar que las diferencias de fenotipo encontradas entre los ratones APP y APP-PK+/- se deban a un número de insertos del gen APP diferente en nuestras distintas líneas de ratones, se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real. El análisis mediante una PCR cuantitativa nos permite comparar la cantidad de transgen APP_{swe} humano en los mutantes APP y APP/PK+/-, viendo la variación en el número de copias entre los dos grupos. Como se observa en la figura 18D el límite de detección en ambas líneas es similar, por tanto el número de copias también lo es y los resultados obtenidos no son debidos a diferente carga génica de APP en las distintas líneas de transgénicos.

Los niveles de proteína parkina también se analizaron mediante WB, confirmando la ausencia total de parkina en los grupos KO: PK^{-/-} y APP_{swe}/PK^{-/-} y una reducción significativa en los grupos heterocigotos: PK^{+/-} y APP_{swe}/PK^{+/-} respecto de WT (Figura 18E).

Los niveles de β -amiloide, fracciones soluble y total, analizado mediante técnica de ELISA, mostraron que los ratones APP_{swe}/PK^{+/-} tienen niveles ligeramente menores (no significativos) de amiloide en las fracciones total y soluble que los APP_{swe} (Figura 19). Sin embargo los niveles por el contrario de los APP/PK^{-/-} sí fueron significativamente menores en comparación con los APP_{swe} (Figura 20C).

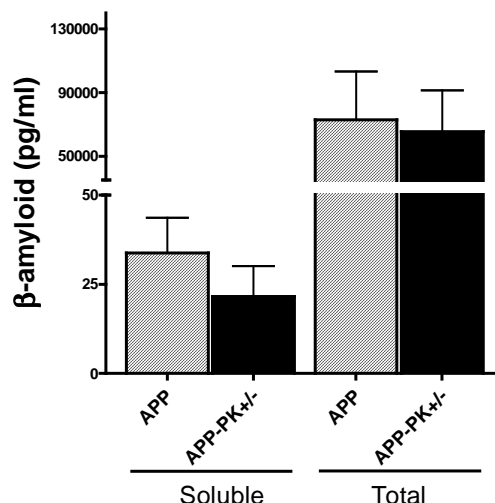


Figura 19. Análisis de las fracciones β -amiloide soluble y total en los grupos APP y APP/PK^{+/-} por ELISA. $\square \pm$ SEM (n = 9).

Los ratones APP_{swe} de 12 y 16 meses de edad tienen un incremento significativo en el número de placas en comparación con los WT. El análisis del número de placas de amiloide en córtex e hipocampo mostró un ligero aumento en los ratones APP_{swe} de 16 meses en comparación con los sacrificados a los 12 meses. Por el contrario los APP_{swe}/PK^{+/-} no mostraron esta tendencia referente a la edad. Los ratones APP_{swe}/PK^{+/-} tienen una disminución significativa en el número de placas A β con respecto a sus respectivos APP_{swe} (Figura 20B). Estas diferencias aumentan en los ratones APP_{swe}/PK^{-/-} vs APP_{swe} (Figura 20D). Se observaron niveles mínimos de placas neuríticas en los ratones WT y PK, tanto hetero como homocigotos, (Figura 20A, B, D y E) a los 12 como a los 16 meses de edad.

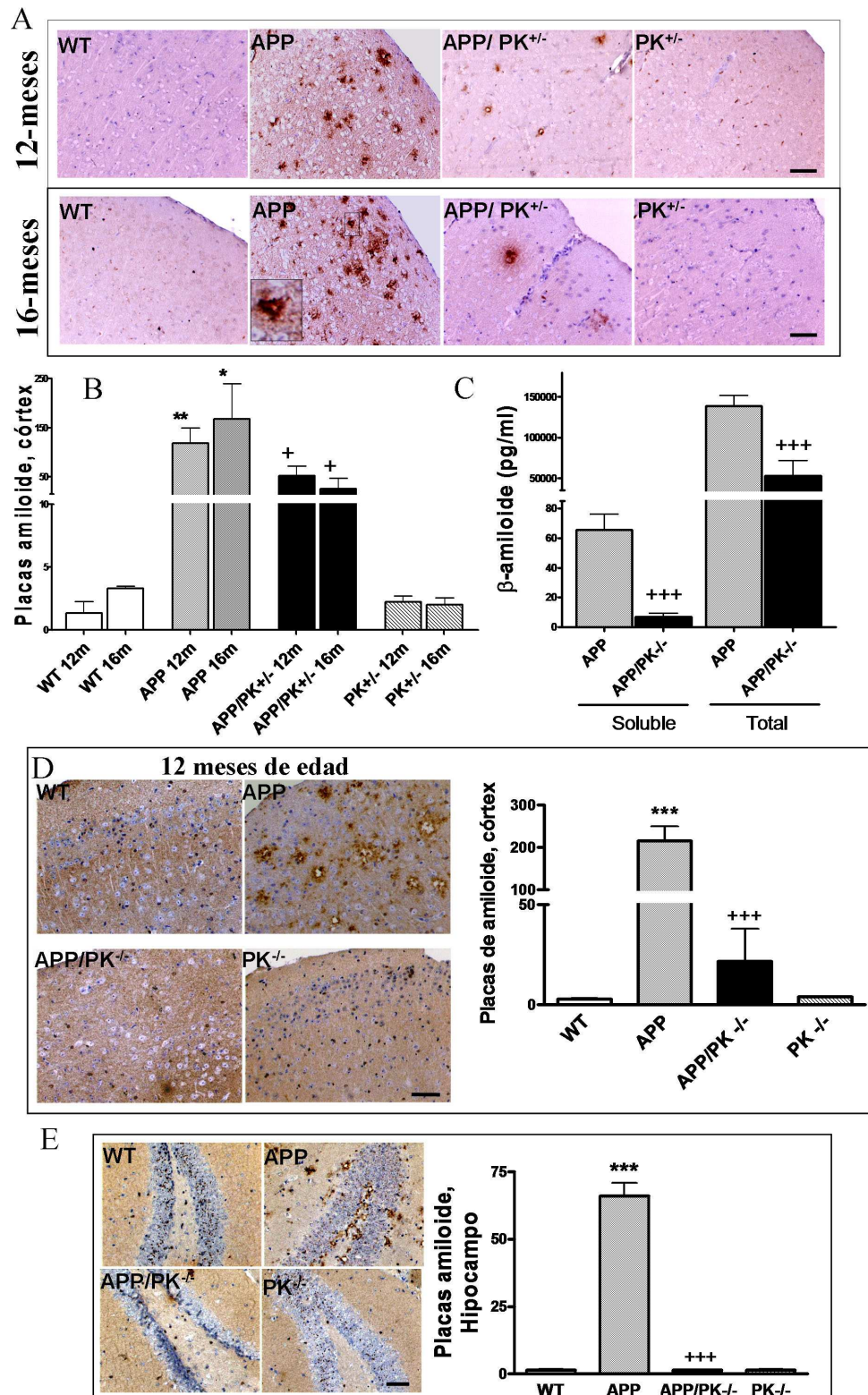


Figura 20. Placas de β -amiloides y niveles de A β soluble y total. (A) Microfotografías representativas de córtex cerebral de los ratones WT, APP, APP/PK^{+/-} y PK^{+/-} de 12 y 16 meses y (B) Histograma correspondiente al número de placas de β -amiloides. (C) Análisis de A β soluble y total en ratones WT, APP, APP/PK^{-/-} y PK^{-/-} de 12 meses de edad por ELISA. $\square \pm$ SEM (n = 9). (D) Microfotografías e histograma representativas de placas de amiloide en córtex y en hipocampo (E) de animales WT, APP, APP/PK^{-/-} y PK^{-/-} de 12 meses de edad. Inmunohistoquímica con anticuerpo anti-A β (1-42) (escala = 100 μ m). Inclusiones de histogramas n = 7-10 por grupo. Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido de test "Newman-Keuls". *p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001 vs WT; +p<0.05; +++p<0.001 vs APP.

1.3 Muerte celular por apoptosis en ratones APP_{SWE} y APP/PK

Investigamos la influencia de la supresión de la parkina en la apoptosis celular en los ratones APP_{SWE}. Sorprendentemente el número de células apoptóticas (TUNEL+) encontradas en el córtex e hipocampo (Figura 21A) cerebral disminuyen en los ratones APP_{SWE}/PK+/- en comparación con los niveles de APP_{SWE} (Figura 21B y C). La muerte que se observa en los APP se ve revertida en el grupo doble transgénico APP_{SWE}/PK+/- recuperando niveles de los controles WT. Además el cociente de proteínas pro / anti-apoptóticas, Bax / Bcl2, incrementando significativamente en los ratones APP_{SWE}, también revierte su expresión en los dobles mutantes APP_{SWE}/PK tanto heterozigotos como homozigotos (Figura 21D).

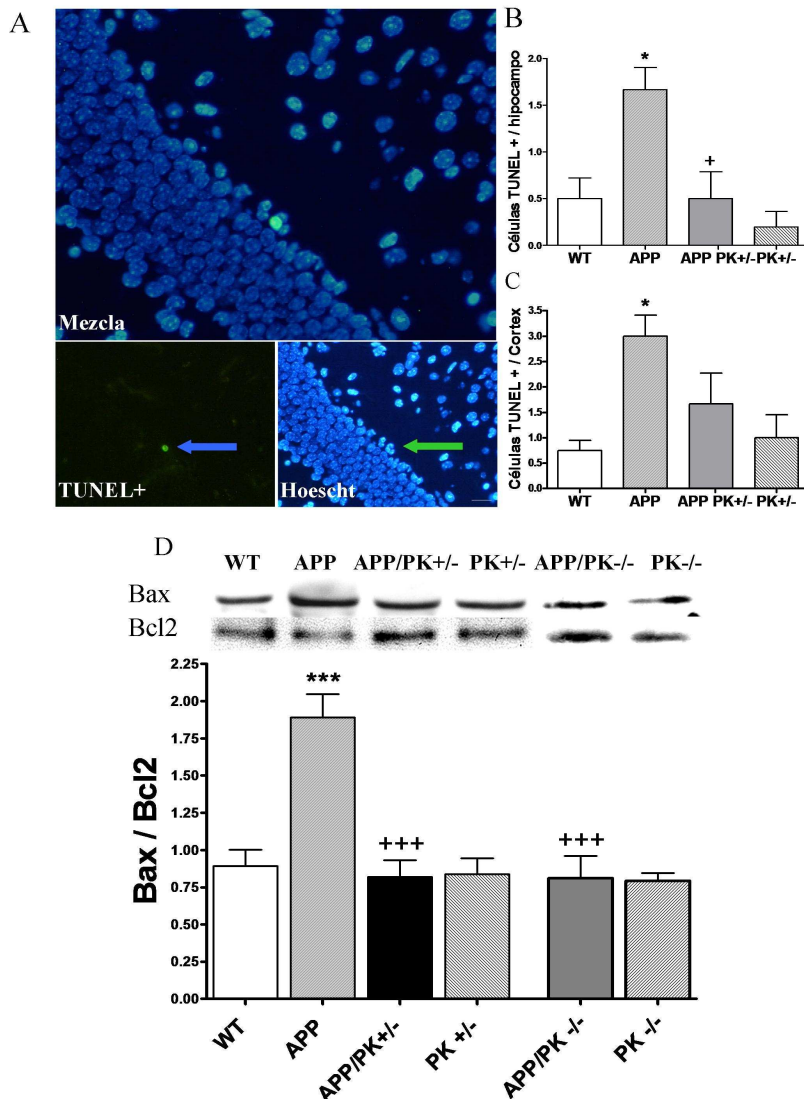


Figura 21. Células apoptóticas y proteínas pro y anti-apoptóticas en ratones de 12 meses. (A) Microfotografías de una célula TUNEL+ y su correspondiente Hoechst (escala = 20µm a 20X). **(B)** Contaje de células apoptóticas por la técnica TUNEL en hipocampo y **(C)** cortex (n = 5-6 animales con 2 cortes cada uno) en animales WT, APP_{SWE}, APP/PK+/- y PK+/- de 12 meses. **(D)** Ratio de proteínas pro/anti-apoptóticas Bax/Bcl2 e imagen representativa de WB en los 6 grupos experimentales en los animales WT, APP, APP PK+/-, PK+/-, APP/PK-/- y PK-/- a los 12 meses de edad. Datos WB presentados como $\square \pm$ SEM (n = 12). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido de test "Newman-Keuls". *p<0.05, ***p<0.001 vs WT; +p<0.05, +++p<0.001 vs APP.

La Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa (PARP-1), es una enzima nuclear de 116 kDa. Una de las funciones biológicas de la PARP-1 es la reparación del ADN y el mantenimiento de la integridad del genoma, funciona como sensor activándose en respuesta al daño, señalizando en la ruptura de su cadena. Cuando la intensidad del daño al que esta expuesto el ADN es severa, el estrés oxidativo induce una sobreactivación de PARP -1, que tras consumir el NAD⁺ y deplecionar el ATP de las células, produce disfunción celular y muerte.

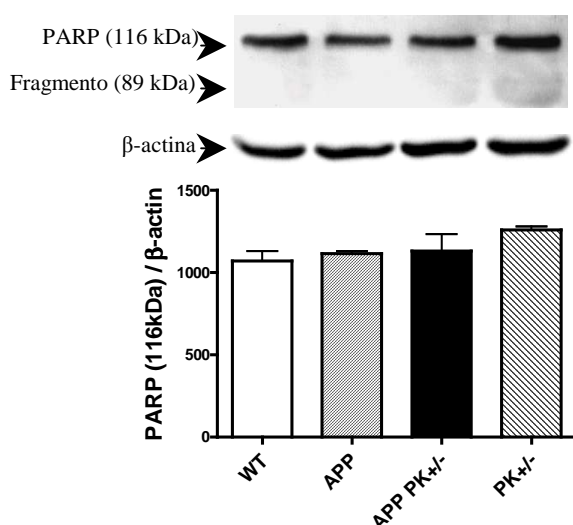


Figura 22. Imagen de WB de la proteína PARP sin procesar a 116 KDa y la altura del fragmento correspondiente a su procesamiento, en la activación de la apoptosis. Datos WB presentados como $\square \pm$ SEM (n = 4).

Por tanto, la presencia de la proteína PARP sin procesar, completa (Figura 22), apoya la hipótesis de que no existe una activación de las caspasas, fruto de un tratamiento de toxicidad aguda. Este hecho es explicable si se tiene en cuenta que se trabaja con un modelo de ratones *in vivo*, donde todos los mecanismos de compensación están activos y el fenotipo de los ratones APP_{swe} a los 12 meses no esta muy desarrollado, ni en fase terminal.

Los dobles mutantes muestran un modelo de enfermedad neurodegenerativa progresiva, en el que a los 12 meses aún funcionan los mecanismos de compensación referente a la muerte celular por apoptosis, demostrada por técnicas de TUNEL y WB (determinación de las proteínas pro-apoptóticas). Estos datos indican una mayor muerte en los animales APP_{swe}, que esta reducida en los dobles mutantes APP_{swe}/PK^{+/-} y APP_{swe}/PK^{-/-}.

1.4 Estudio de gliosis en ratones APP y APP/PK

El termino gliosis se utiliza ante la proliferación de células de la glía en zonas del SNC lesionadas ó bajo el efecto del envejecimiento, siendo un factor muy importante en las enfermedades neurodegenerativas. En nuestro modelo

observamos un aumento de la astrogliosis en los animales APP_{swe}, significativo en comparación con los ratones WT y dobles mutantes APP_{swe}/PK tanto hetero como homocigotos. Esta reversión de los dobles mutantes se consiguió ver mediante técnicas de valoración de imágenes del hipocampo usando un anticuerpo anti-GFAP (Figura 23A y B) y valorando el área y la intensidad lumínica (IOD). Este anticuerpo se une a la proteína ácida fibrilar de la glía, que conforma el citoesqueleto de las células gliales (astrocitos y células de Schwan) mostrando el perfil de los astrocitos. La disminución de los dobles transgénicos frente al grupo APP_{swe} también se confirmó con el mismo anticuerpo por Western blot (Figura 23C).

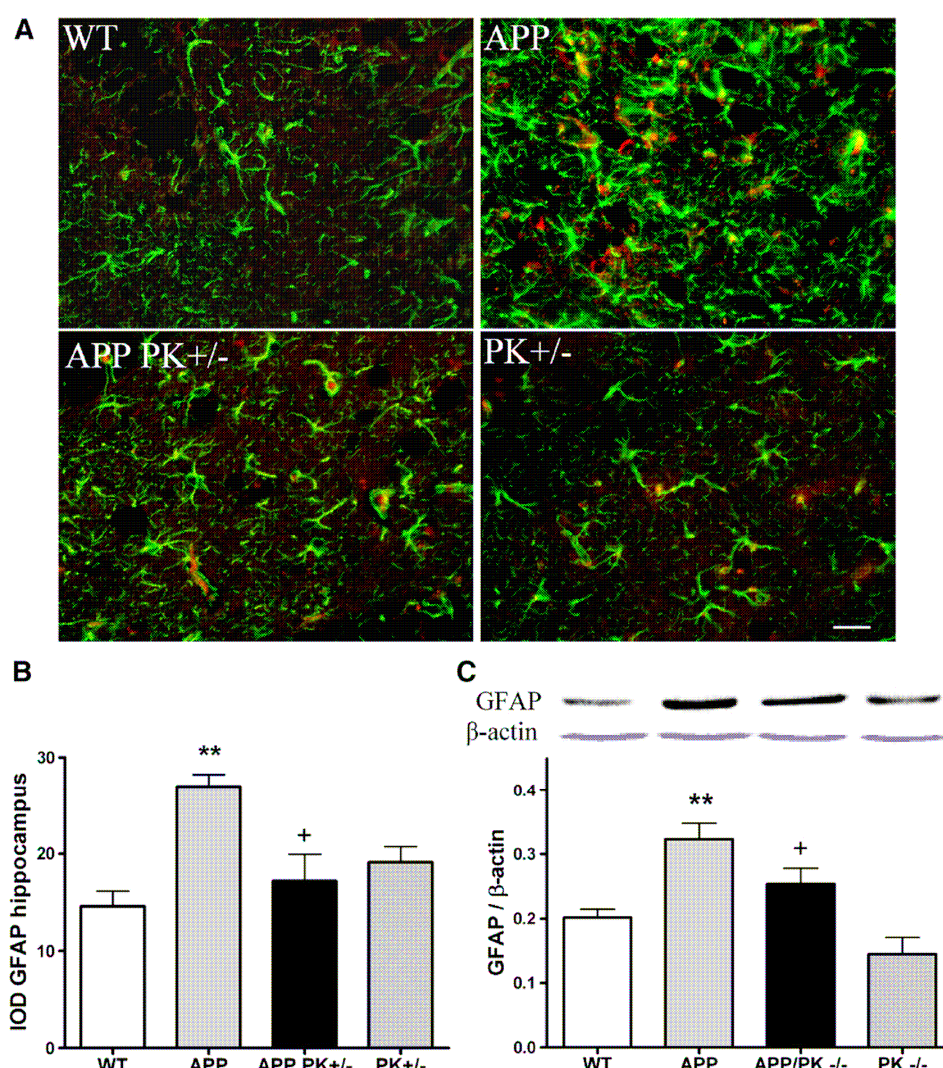


Figura 23. Cuantificación de la astrogliosis. (A) Cuantificación de la glia. Imágenes de la reacción en hipocampo con el anticuerpo anti-GFAP en WT, APP_{swe}, APP/PK+/- y PK+/- a los 12 meses de edad, en verde GFAP y la proteína tau en rojo. Escala (20 μm). (B) Cuantificación de la reacción astrogliosis mediante la toma de imágenes y posterior valoración mediante software informático. Los datos están en unidades arbitrarias (IODS). La astrogliosis es mayor en el grupo APP_{swe} en comparación con el resto de grupos de análisis. (C) Western blot usando el mismo anti-GFAP en ratones WT, APP_{swe}, APP/PK-/- y PK-/- a los 12 meses de edad. Los datos corresponden a $\bar{x} \pm \text{SEM}$ (n = 6). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido de test "Newman-Keuls". **p<0.01 vs WT; +p<0.05 vs APP.

1.5 Acumulación de tau total y fosforilada en ratones APP_{swe} y APP/PK+/-

La proteína tau es una proteína que forma los microtúbulos y abunda en las neuronas, su función principal es la estabilización de los microtúbulos axonales junto con la proteína tubulina. Pero también la proteína tau participa en la regulación del tráfico de células nerviosas por el axón, uno de los motivos por los que se la relaciona con las enfermedades neurodegenerativas, su fosforilación produce la pérdida de la estabilidad de la proteína, su agregación en ovillos neurofibrilares intraneuronales y de otras proteínas como el β -amiloide. En la EA se observa una hiperfosforilación de tau; como consecuencia, el armazón estructural de la membrana se altera, modificando a su vez el tráfico axonal y produciendo la pérdida de conexiones neuronales.

Se observaron placas neuríticas de tau inmunoreactivas en APP_{swe} y APP_{swe}/PK^{+/-}, especialmente en los transgénicos simples en comparación con los dobles (Figura 24A). Los niveles de la proteína tau, medidos con el anticuerpo anti-tau5, midiendo tau total, en WB aumentaron significativamente en el grupo APP_{swe} respecto de los animales controles WT (Figura 24B). También se observó una disminución de los niveles de tau total en PK+/- respecto de WT.

Los niveles de tau fosforilada (P-Tau), obtenidas en las fracciones extraídas con guanidina, aumentaron en APP_{swe} y APP_{swe}/PK+/-, no obstante se produce una diferencia entre estos dos grupos siendo menor el aumento en los dobles transgénicos respecto los simples APP_{swe} (Figura 24C).

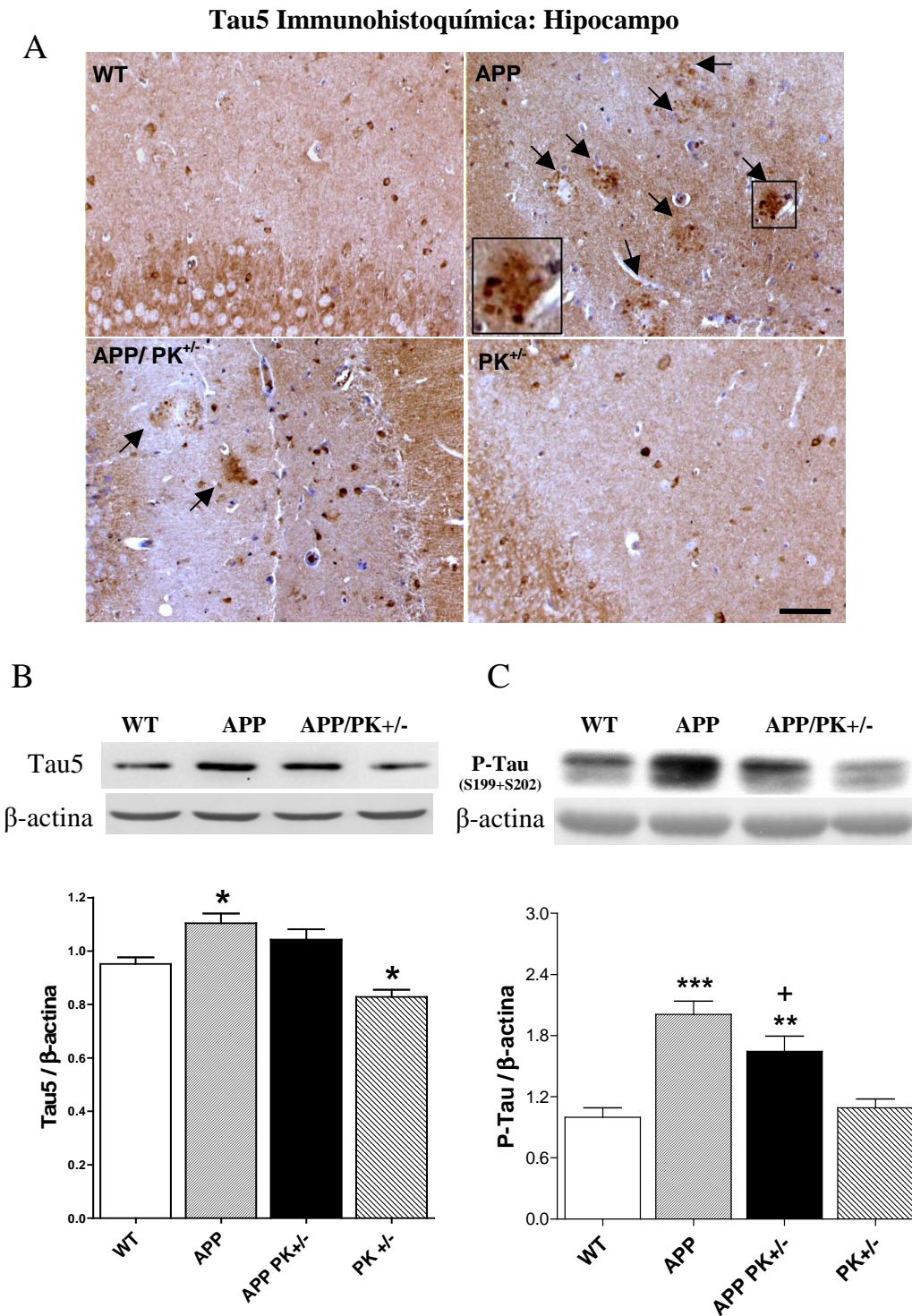


Figura 24: Acumulación de tau, total y fosforilada en los 4 grupos experimentales a los 12 meses de edad. (A) Imagen representativa de la patología tau usando un anticuerpo anti-tau total en hipocampo. (Escala = 20 μ m, magnificación 20X). **(B)** Western blot representativos de la preteína tau total, usando tau-5, en la fracción soluble de las muestras. **(C)** Western blot y cuantificación de la valoración de la proteína tau fosforilada, usando anti-tau fosforilada (en los residuos serina 199 y 202) en la fracción de guanidina. Los valores en ambos WB son $\square \pm$ SEM (n = 12 en WT y APP; n = 6 en resto de grupos experimentales). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido de test "Newman-Keuls". *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs WT; +p<0.05 vs APP.

1.7 Niveles de chaperonas

HSP70 (Heat Shock Protein) pertenece a una familia de chaperonas de respuesta a estrés celular, en su papel de chaperona facilita el correcto plegamiento de las proteínas reduciendo su conformación aberrante y por tanto su agregación.

CHIP es una E3 ligasa, que interacciona con parkina y actúa en el marcaje de proteínas para la degradación vía proteosoma, también interacciona con HSP70 aumentando la eliminación y el correcto plegamiento de las proteínas (Imai et al. 2002).

El complejo CHIP-HSP70 degrada la proteína tau (Imai et al. 2002; Petrucelli et al. 2004; Shimura et al. 2004; Sahara et al. 2005) y actúa específicamente en la eliminación de β -amiloide (Kumar et al. 2007), las proteínas HSP70 y CHIP aumentaron en los dobles mutantes de APP_{swe} y parkina (APP_{swe}/PK+/- y APP_{swe}/PK-/-) en comparación con WT y APP (Figuras 25A y 25B). Considerando las proteínas HSPs como de respuesta no selectiva a estrés, se puede comprender que ambas líneas PK+/- y APP_{swe}/PK+/- expresan mayores niveles neuroprotectores de las proteínas CHIP y HSP70.

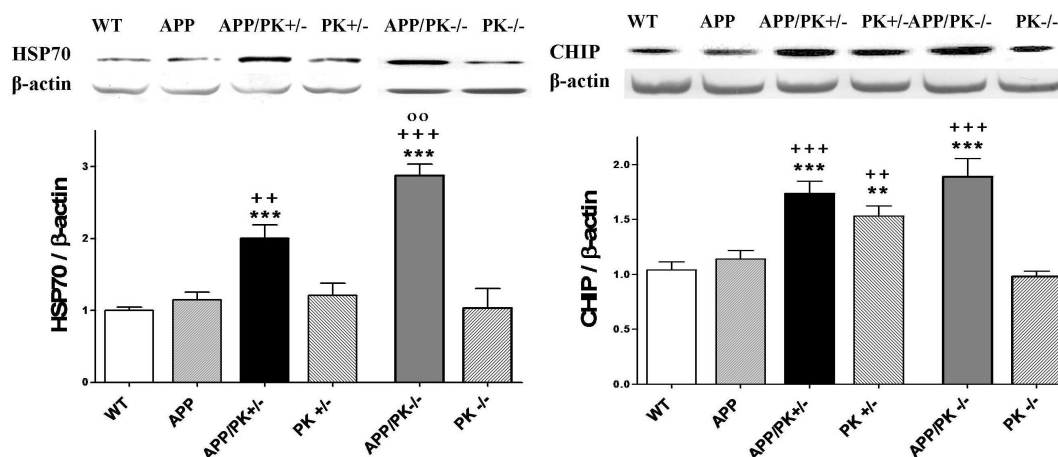


Figura 25. Expresión de chaperonas en WT, APP_{swe}, APP/PK+/-, PK+/-, APP/PK-/- y PK-/-. (A) Western blot representativo y valores de HSP70 y (B) CHIP corregidos por β -actina. $\square \pm$ SEM (n = 12 en WT y APP; n = 6 en resto de grupos experimentales). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido de test "Newman-Keuls". **p<0.01, ***p<0.001 vs WT; ++p<0.01, +++p<0.001 vs APP; °°p<0.01 vs PK-/-.

1.8 Marcadores de autofagia

Otro gran sistema de eliminación de agregados es la autofagia. En la autofagia se generan vesículas de doble membrana, autofagosomas, en los

que se engloban las sustancias citoplasmáticas a degradar, posteriormente se fusionan con las vesículas con enzimas hidrolíticas, los lisosomas, y se forman los autofagosomas. Además la autofagia actúa en colaboración con las chaperonas para la eliminación de proteínas mal conformadas.

Los niveles del ratio LC3II / LC3I y la Beclina-1, ambos marcadores directos de actividad autofágica, están aumentadas en APP_{swe}/PK+/- respecto a los ratones APP_{swe} (Figura 26B y 26C). Apoyando estos datos, encontramos que la proteína p62, considerada como sustrato de la autofagia, se ve disminuida en los ratones APP_{swe}/PK+/- respecto de los APP_{swe} (Figura 26A).

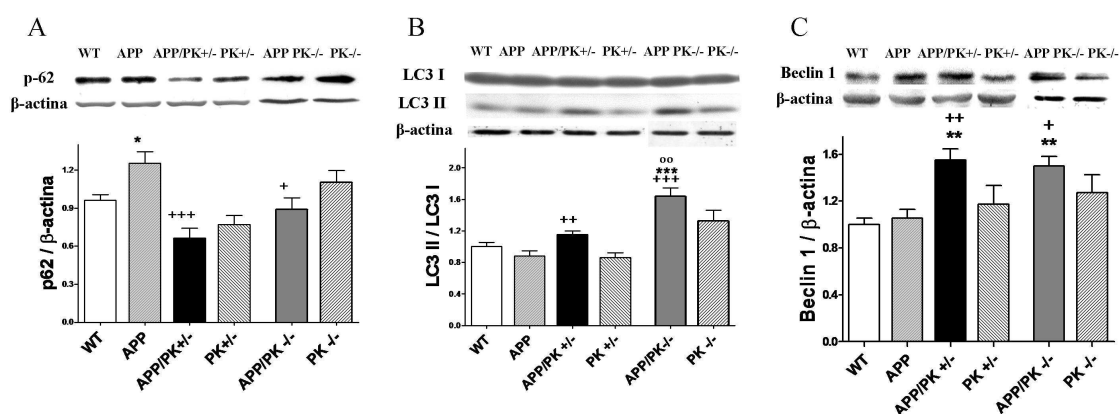


Figura 26. Marcadores de autofagia en los 6 grupos experimentales (A) Cuantificación de la proteína sustrato de autofagia p62 corregida por actina. (B) LC3, bandas II y I junto con su correspondiente actina, representada la cuantificación del ratio LC3II/LC3I. (C) Beclina-1 en los grupos de análisis como marcador de autofagia. Datos mostrados como $\square \pm$ SEM (n = 12 en WT y APP; n = 6 en resto de grupos experimentales). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido de test "Newman-Keuls". *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs WT; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001 vs APP; °°p<0.01 vs PK-/-.

Un aumento de la expresión de la chaperonas y de la autofagia, en los dobles mutantes, parece jugar un papel importante disminuyendo la patología relacionada con la enfermedad de Alzheimer en estos modelos. Produciendo en último término la disminución de los acúmulos de las proteínas tau, tanto total como fosforilada, y β-amiloide y los niveles de muerte celular en el modelo APP_{swe}.

1.9 Actividad del proteosoma en ratones APP y APP/PK+/-

El proteosoma es el complejo proteico encargado de la eliminación final de las proteínas previamente marcadas para degradación con ubiquitina (UPS, Ubiquitin Proteosome System). El proteosoma esta formado por dos clases de

unidades: α que ejercen como "puertas" reconociendo la ubiquitina y permitiendo la entrada hacia las subunidades β , con capacidad catalítica.

Se estudiaron los niveles catalíticos, actividad quimi tripsina y tripsina del proteosoma (Figura 27B y 27A). Los niveles de ambas actividades estaban disminuidos en la línea APP_{swe} en comparación con los WT y ambas también se ven normalizadas en los dobles mutantes APP_{swe}/PK^{-/-}. No se encontraron cambios en la actividad Peptidil Glutamil Peptidasa (PGPH) del proteosoma.

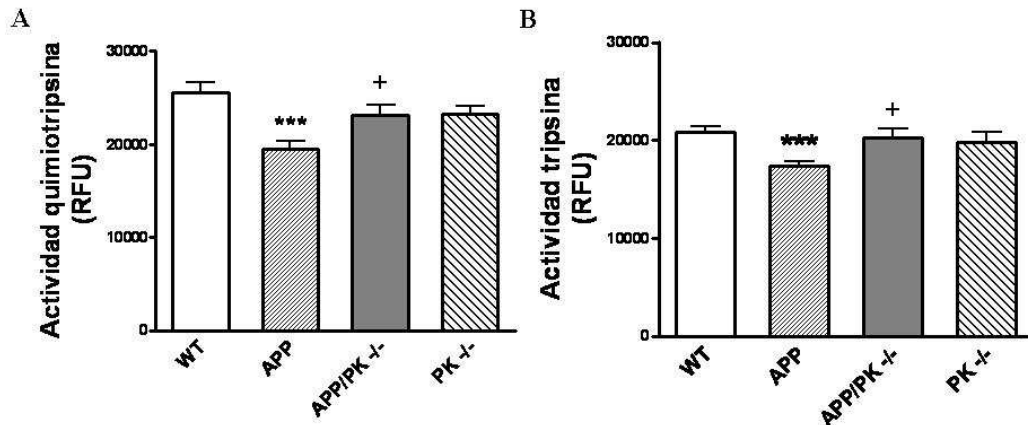


Figura 27. Actividad del proteosoma en WT, APP_{swe}, APP/PK^{-/-}, PK^{-/-} a los 12 meses de edad. (A) Actividad quimi tripsina y tripsina **(B)**, obtenidos de hemisferios de los grupos experimentales. Los datos son $\square \pm$ SEM (n = 5-6 por grupo). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido de test "Newman-Keuls". ***p<0.001 vs WT; +p<0.05 vs APP.

ANEXO I

RESULTADOS hembras de 12 meses: WT, APP_{swe}, APP/PK+/-, PK+/-

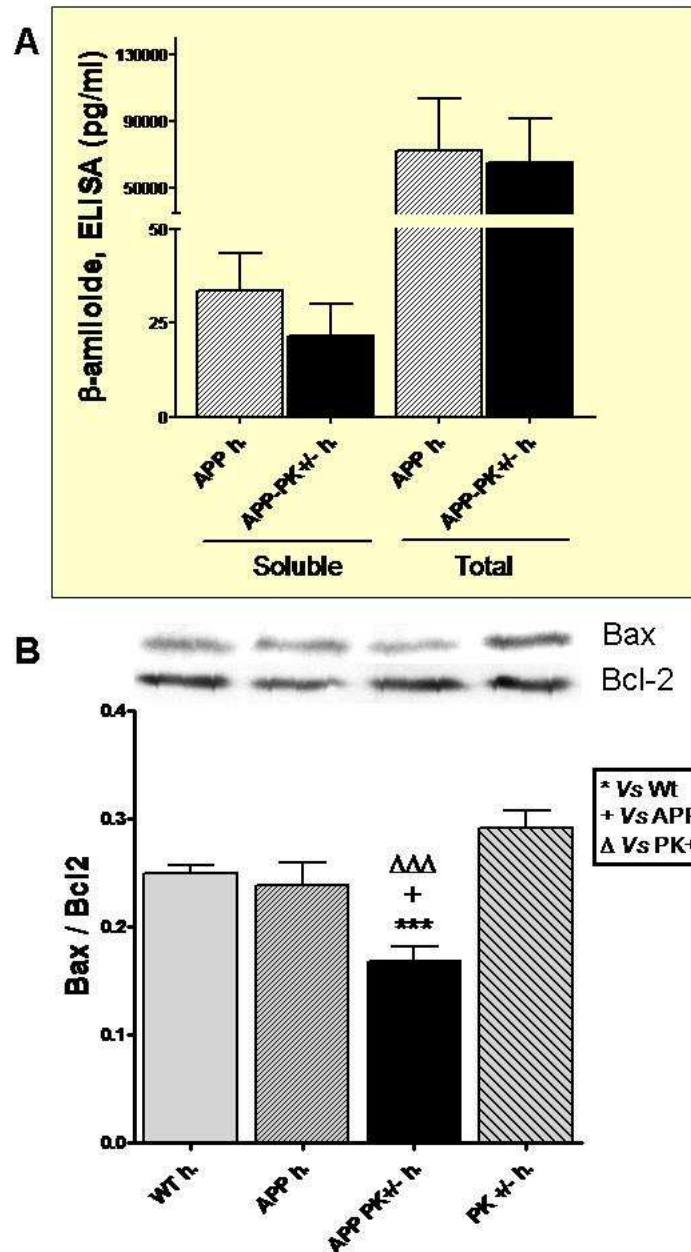


Figura 1 ANEXO. Cuantificación de amiloide y proteínas de muerte en muestras de hembras de 12 meses WT, APP_{swe}, APP/PK+/- y PK+/- . **(A)** Análisis de amiloide mediante ELISA en fracciones soluble y total en hembras de 12 meses. No se observan diferencias significativas entre los APP_{swe} y los dobles mutantes. **(B)** Imagen representativa y cuantificación de WB. Cociente de proteínas pro y anti-apoptóticas (Bax/Bcl2) en hembras. Como variación de la respuesta en machos, las ratonas APP no aumentan el cociente, pero si se observa una bajada significativa del cociente de proteínas pro / anti-apoptóticas en las hembras dobles mutantes APP/PK+/- . Los datos se expresan como $\bar{x} \pm \text{SEM}$ (n = 7 en figura A; n = 6 en figura B). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido de test "Newman-Keuls". ***p<0.001 vs WT; +p<0.05 vs APP; $\Delta\Delta\Delta$ p<0.01 vs PK+/- .

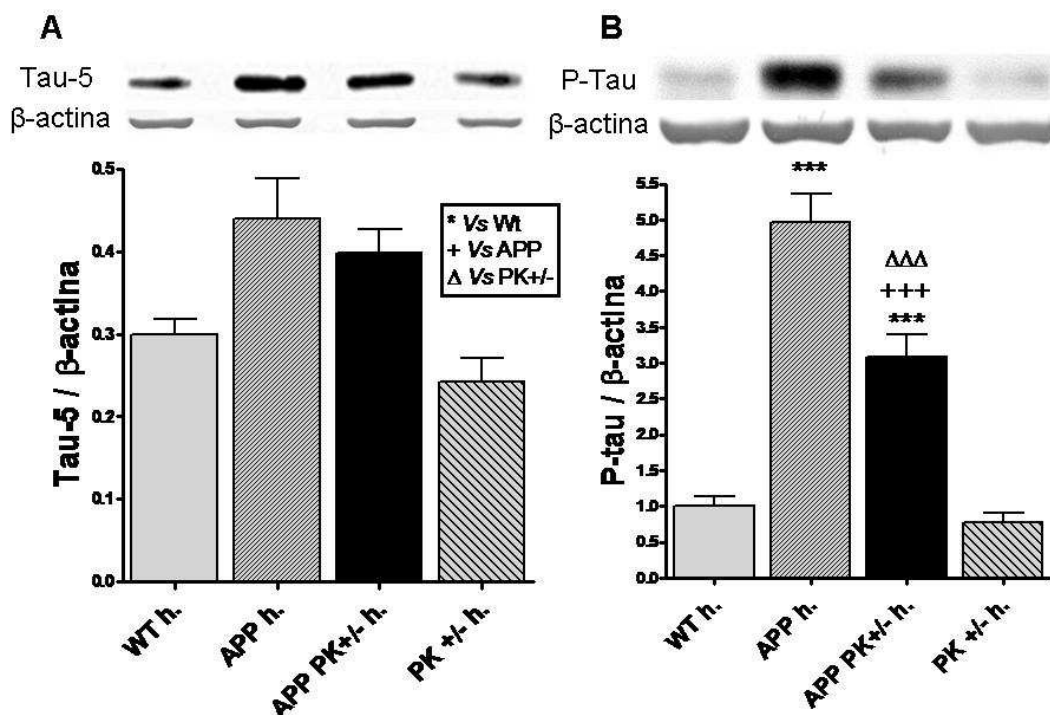


Figura 2 ANEXO. Expresión de tau total y tau fosforilada en hembras de 12 meses WT, APP_{swe}, APP/PK+/-, PK+/- . **(A)** Western blot representativo e histograma correspondiente a la expresión de tau total y **(B)** tau fosforilada corregidos por β-actina en hembras de 12 meses. □ ± SEM (n = 12 en WT, APP, APP/PK+/- y n = 9 en PK+/- en figura A; n = 12 en figura B). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido de test "Newman-Keuls". ***p<0.001 vs WT; +++p<0.001 vs APP; ΔΔΔp<0.01 vs PK+/-.

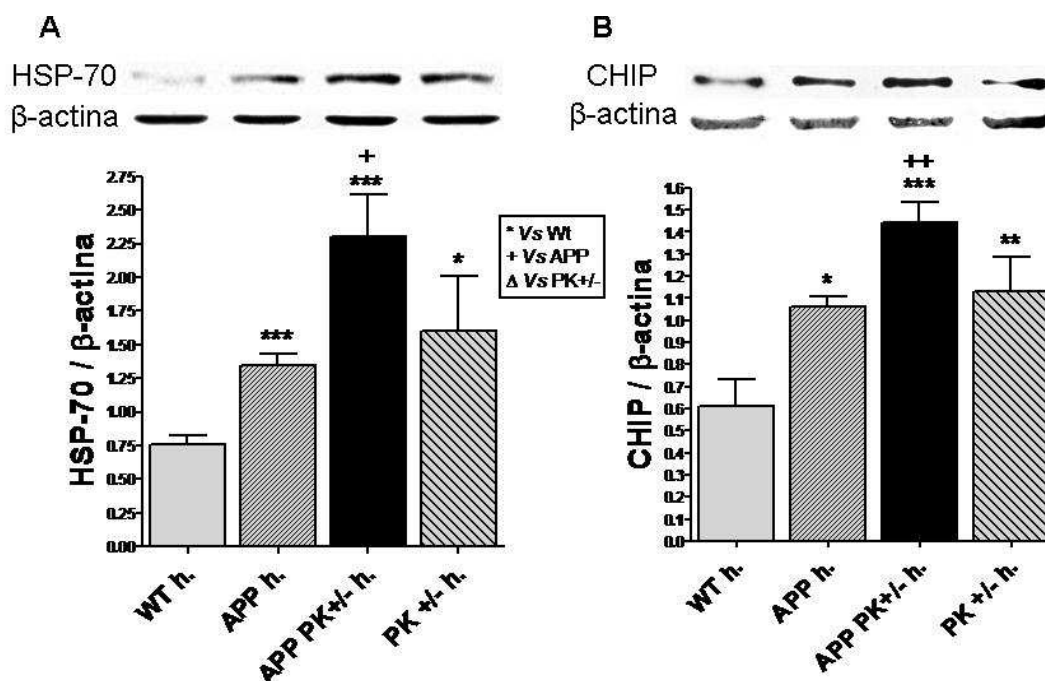


Figura 3 ANEXO. Expresión de HSP-70 y co-chaperona CHIP en hembras WT, APP_{swe}, APP/PK+/- y PK+/- de 12 meses. **(A)** Western blot representativo y valores de HSP70 y **(B)** CHIP corregidos por β-actina en las hembras 12 meses de edad. □ ± SEM (n = 13 en WT, APP y n = 8 en APP/PK+/- y PK+/- en figura A; n = 6-7 en figura B). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido de test "Newman-Keuls". *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs WT; +p<0.05, ++p<0.01 vs APP.

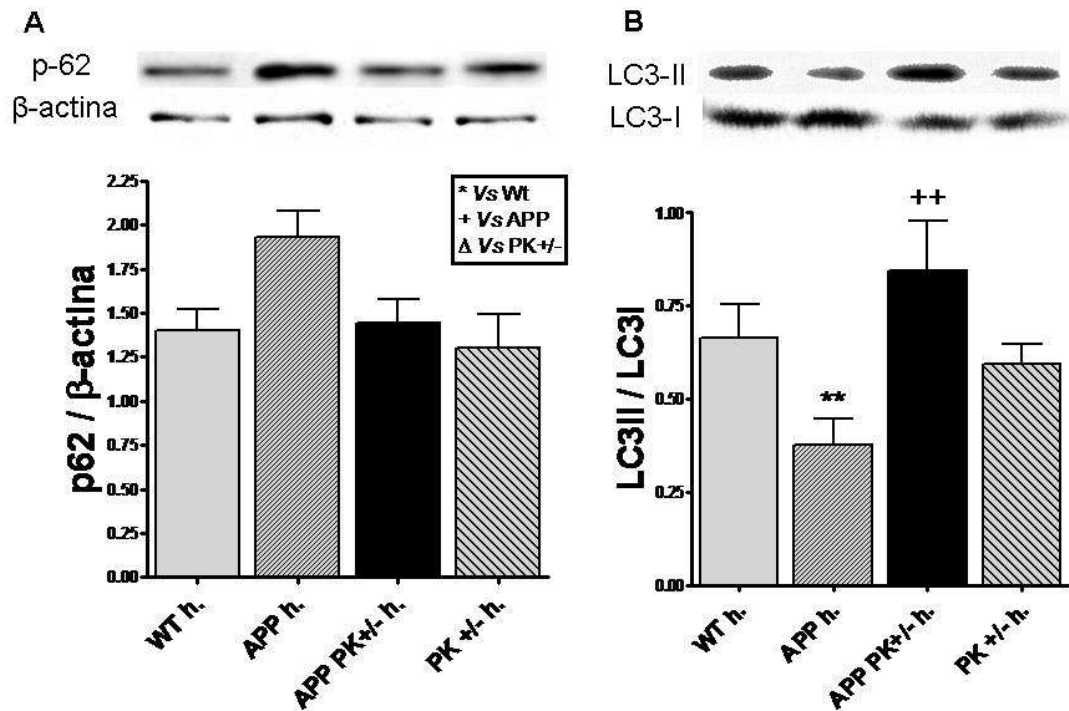


Figura 4 ANEXO. Marcadores de autofagia en hembras de los grupos WT, APP_{swe}, APP/PK+/-, PK+/-
(A) Cuantificación e imagen de la proteína sustrato de autofagia p62 corregida por β-actina en ratonas de 12 meses de edad. **(B)** LC3, bandas II y I y representación de la cuantificación del ratio LC3II/LC3I, considerado índice directo de la reacción autofágica en hembras de los 4 genotipos. Datos mostrados como $\square \pm \text{SEM}$ (n = 10 en todos los grupos experimentales). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido de test "Newman-Keuls". **p<0.01 vs WT; ++p<0.01 vs AP

II. TRATAMIENTO CRÓNICO CON ISOFLURANO EN UN MODELO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Existen múltiples trabajos epidemiológicos que vinculan de manera estadística el riesgo de padecer EA a edades avanzadas, con el número de procedimientos anestésicos a lo largo de la vida (Bohnen et al. 1994). Posteriormente se realizaron estudios *in vitro* y en la actualidad se están realizando *in vivo* probando esta correlación. La llamada *disfunción cognitiva posoperativa* (POCD en inglés), producida tras intervenciones con anestesia general, de carácter temporal y leve, y la EA parecen estar cada vez más relacionadas a la luz de las últimas investigaciones. Cuanto más se aprende sobre la relación y acción de los anestésicos sobre el SNC, mayor preocupación se muestra sobre la seguridad de estos productos y sus efectos a largo plazo (Baranov et al. 2009).

Nuestra intención fue simular en el modelo de EA, ratón transgénico Tg2576 con mutación APP_{swe}, una situación de acumulación de intervenciones anestésicas a lo largo de la vida, valorando posteriormente el estado de la patología del ratón. Una de las conclusiones de trabajos previos es que los anestésicos volátiles tienden a agregar más el β -amiloide, aumentando además la muerte celular en cultivos. Por ello se escogió el Isoflurano, un anestésico de amplio uso en clínica, con base química similar a anestésicos de última generación.

Se utilizaron ratones APP_{swe} de 7 hasta los 10 meses de edad para emular una situación preclínica, aún no tienen desarrollo de placas, y durante 3 meses se realizaron anestесias repetidas 3 veces por semana, controlando todas las variables cardiovasculares, de oximetría y de temperatura corporal. Se analizó el comportamiento y al sacrificio de los animales se realizaron estudios de histología y bioquímica para determinar el estado de los animales.

Los objetivos del diseño experimental fueron: testar la validez de un sistema de anestesia acumulativo en un modelo de EA como factor modificador de la toxicidad en EA y una vez confirmada la validez del modelo, estudiar la progresión de la patología con diversas técnicas experimentales.

2.1 Supervivencia y comportamiento de los ratones APP_{swe} a la anestesia repetida con isoflurano

Se realizó un análisis de la supervivencia de los ratones APP y WT utilizando el método de Kaplan-Meier en los ratones sometidos a anestesia durante el periodo de experimentación (3 meses). Durante el periodo de observación, desde los 7 a los 10 meses de edad, no hay diferencias en supervivencia entre los ratones WT y APP no tratados. La exposición repetida a anestesia con isoflurano no altera la supervivencia de los WT pero sí la reduce significativamente en los APP_{swe} (Figura 28A). Además, dos de las muertes en los APP se produjeron inmediatamente después del proceso anestésico, en el tiempo de "edución" (despertar de la anestesia), así que debemos suponer que la diferencia observada entre APP_{swe} y WT se debe al tratamiento con isoflurano. Esta mayor sensibilidad al proceso anestésico nos hizo reducir la duración de las exposiciones al isoflurano de ambos grupos de 30 a 20 minutos para minimizar las bajas.

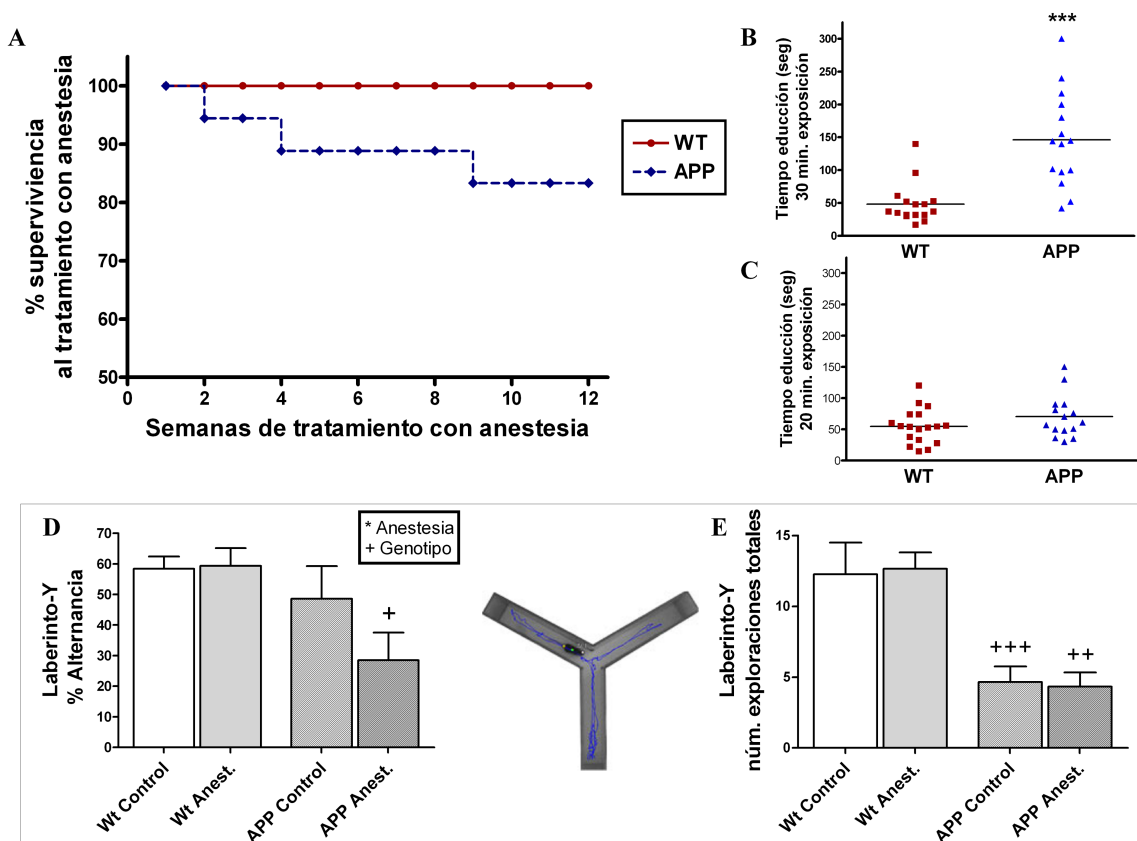


Figura 28. Análisis de la supervivencia, tiempo de educación tras anestesia y actividad en el laberinto en Y. (A) Se registraron las bajas durante el periodo de anestesia en los dos grupos, APP (rombos) y WT (puntos) de los 7 a 10 meses. **(B)** Representación de los tiempos de educación (despertar de la anestesia) de APP frente a WT tras 30 minutos de anestesia. Se observa una diferencia significativa

en la educación del grupo APP frente a WT. **(C)** Educación a los 20 minutos de anestesia, desapareciendo la diferencia entre grupos. **(D)** Alternancia espontánea de los ratones en exploraciones libres en un laberinto Y. Los datos reflejan diferencia significativa en el porcentaje de alternancia en el grupo APP anestesia, y una tendencia en los APP controles frente a sus respectivos WT. **(E)** Exploraciones totales en 5 minutos de prueba. Los valores se expresan como la media \pm SEM ($n = 15-30$). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido de test "Newman-Keuls". $*p < 0.05$, $***p < 0.001$ vs Control anestesia; $+p < 0.05$, $++p < 0.01$, $+++p < 0.001$ vs equivalente WT. Se realizó un Anova de dos vías seguido de Bonferroni en la figura 28E, mostrando que la fuente principal de variación es el genotipo en el tratamiento con isoflurano, ($F(1,43) = 6.80$, $p = 0.0125$).

Los ratones APP y WT sometidos a anestesia mostraron diferencias en los "tiempos de educación" muy interesantes, tras 30 minutos de anestesia con isoflurano se vieron diferencias, tiempos de educación más largos en los APP_{swe}, que se pierden al reducir el periodo de anestesia a 20 minutos (Figura 28B y 28C).

El análisis factorial de los elementos "genotipo y anestesia" muestra potenciación del efecto del genotipo por la anestesia en cuanto a la reducción del índice de alternancia (Figura 28D). En relación con el número total de entradas, están significativamente disminuidos por el genotipo pero no se modifican por la acción de la anestesia (Figura 28E). Esto sugiere que la anestesia disminuye la capacidad exploradora pero no la actividad motora en ratones APP_{swe}.

Durante los procesos anestésicos se realizaron controles y mediciones de electrocardiograma y presión arterial, obteniéndose el ritmo cardiaco, la temperatura corporal, la saturación de O₂ y el ritmo respiratorio (Tabla 9); sin diferencias entre las líneas de ratones (APP y WT, Figura 29).

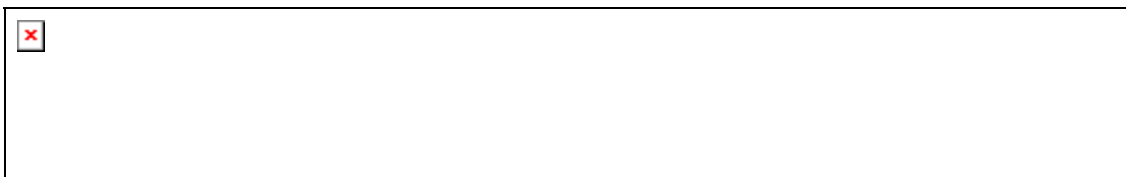


Tabla 9. Presión arterial: sístole, diástole y presión arterial, ritmo cardiaco, temperatura corporal, ventilaciones por minuto y saturación parcial de O₂ en ratones WT y APP ($n = 5$ por grupo experimental).

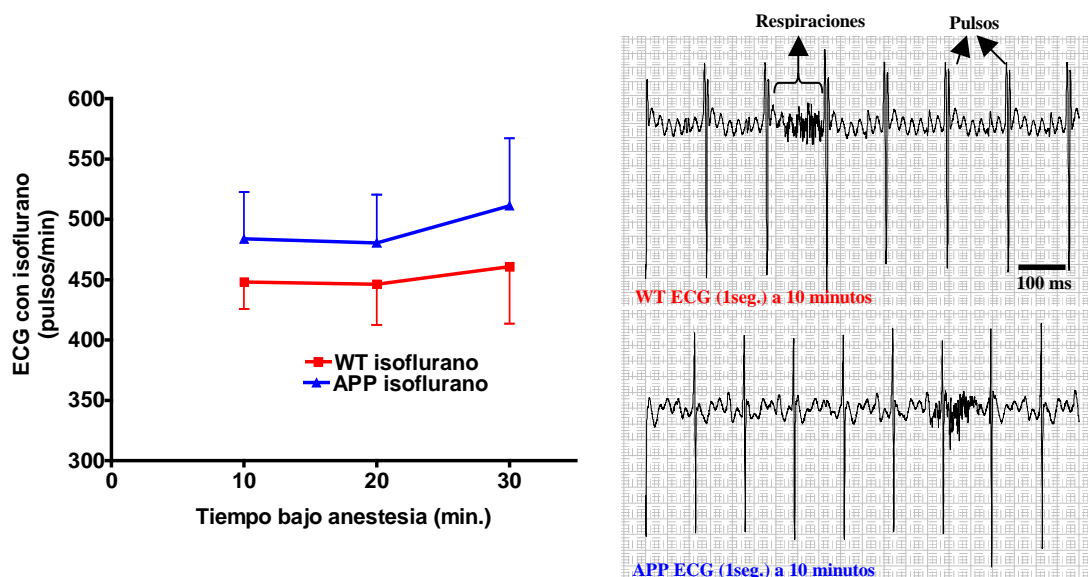


Figura 29. (A) Datos de electrocardiograma de ratones WT y APP sometidos a anestesia con isoflurano. (B) y (C) Electrocardiogramas representativos de WT y APP respectivamente, marcados los eventos respiratorios (se refleja la actividad muscular) y el pulso del ratón.

2.2 Marcadores de muerte y apoptosis en hipocampo

Para el estudio de neurodegeneración se realizó un conteo de las células TUNEL positivas en el hipocampo (Figura 30A y B), que marcarían el final del proceso apoptótico. Se observa un efecto sinérgico del genotipo y del tratamiento con isoflurano encontrándose mayor muerte en los ratones APP sometidos a anestesia. Además estos resultados se apoyan con el análisis de las proteínas pro y anti-apoptóticas: Bax y Bcl2, mediante WB (Figura 30C y D). El cociente Bax / Bcl2 nos daría un índice de expresión de proteínas de muerte. Repitiéndose el patrón visto en inmunoquímica, aumentan los índices de muerte con el isoflurano, exacerbado además con el genotipo APP. El aumento de muerte en TUNEL es significativo en los APP_{swe} con anestesia frente a APP_{swe} control, en WB los animales APP_{swe} muestran niveles significativamente mayores que sus WT correspondientes (Figura 30).

El análisis factorial realizado, muestra en la figura 30D a ambas variables, genotipo y tratamiento con isoflurano, como fuentes de variación en el aumento del ratio proapoptotico Bax/Bcl2.

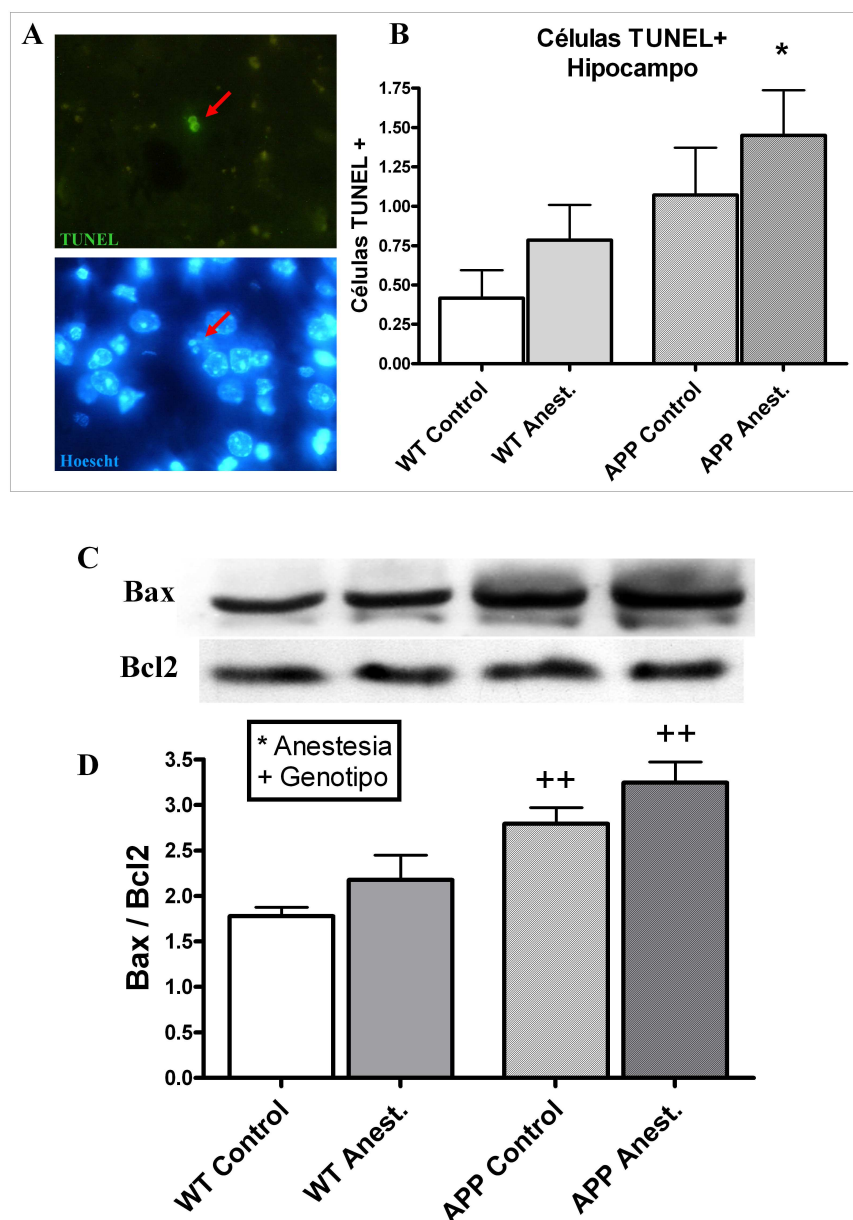


Figura 30. Células apoptóticas en hipocampo e índice de expresión de proteínas de muerte: índice Bax/Bcl2. (A) Imágenes de célula TUNEL positiva (imagen superior) y su correspondiente Hoescht (imagen inferior). **(B)** Cuantificación de células apoptóticas en hipocampo. **(C y D)** Bandas de proteínas Bax (pro-apoptótica) y Bcl2 (anti-apoptótica) e histograma representativo. Los resultados del estudio de muerte parecen mostrar un efecto acumulativo y sinérgico del efecto genotipo y anestesia. Los valores se expresan como la media \pm SEM (Figura B: $n = 15-30$; Figura D: $n = 5$). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido de test "Newman-Keuls". * $p < 0.05$ vs Control anestesia; ++ $p < 0.01$ vs correspondiente WT. Se realizó un análisis Anova de dos vías seguido de Bonferroni en la figura 15B, mostrando el genotipo como fuente de variación $F(1,55) = 7.31$, $p = 0.0091$, y la 15D siendo ambos, genotipo $F(1,17) = 47.28$, $p < 0.0001$ y tratamiento con isoflurano, $F(1,17) = 7.62$, $p = 0.0134$, como fuentes de la variación en la apoptosis celular.

2.3 Efecto de la anestesia en células gliales

Se estudió la influencia de la anestesia como factor de activación glial. En inmunohistoquímica se utilizó un triple marcaje: GFAP (verde) como marcador mayoritario de astrocitos, tau (proteína tau, rojo) y Hoescht (marcador

cromatina nuclear, azul). La astrogliosis aumenta con la anestesia en WT y en APP_{swe} control, pero sorprendentemente disminuye de manera significativa en el grupo APP_{swe} con anestesia (Figura 31A y B).

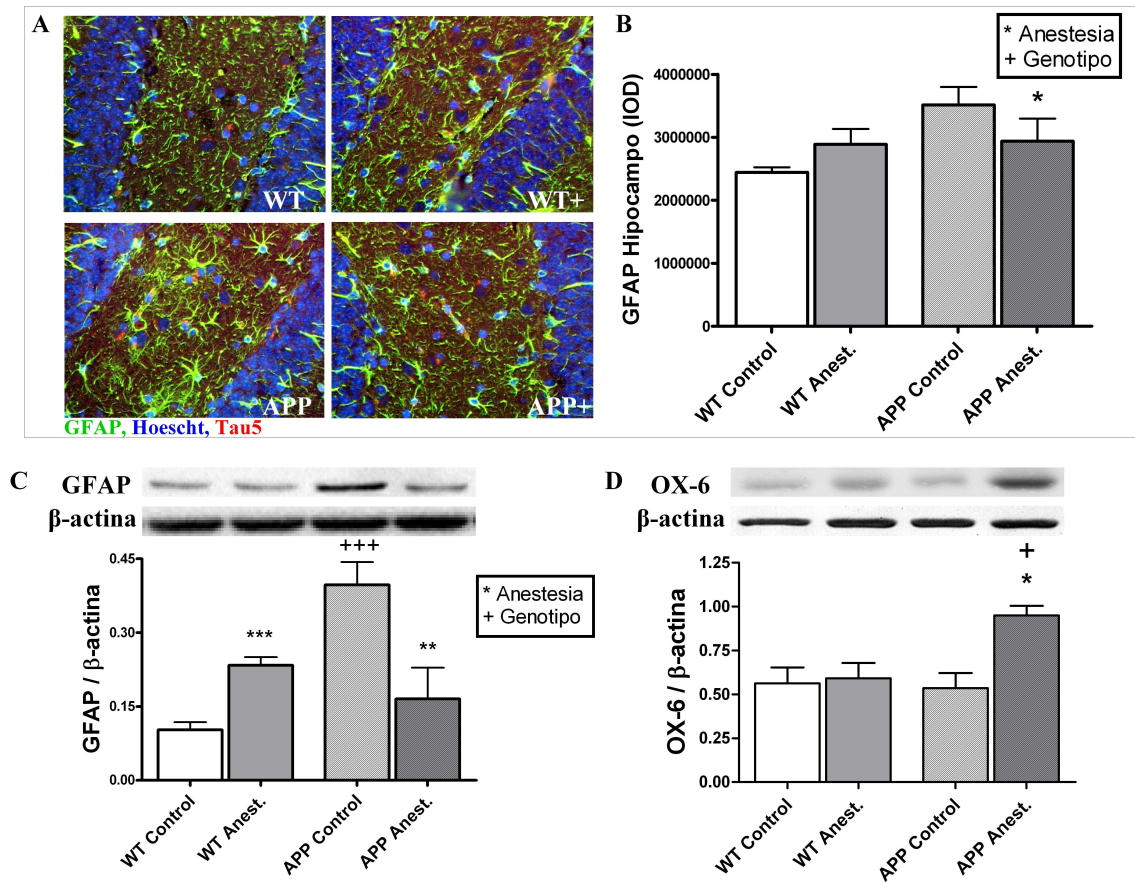


Figura 31. Valoración de astrogliosis y microglía mediante GFAP y OX-6, respectivamente. (A) Micrografías representativas de los 4 grupos experimentales: WT, WT Anestesia (WT+), APP y APP Anestesia (APP+) con GFAP (verde), Hoescht (azul) y Tau (rojo). **(B)** Valoración astrogliosis (IOD de GFAP), se observa un aumento en WT con anestesia y APP control, pero este aumento desaparece en APP con anestesia. **(C)** Bandas e histograma de WB para GFAP. La anestesia aumenta la activación astrogliosis en WT pero la disminuye en APP tratados con isoflurano. **(D)** Bandas proteicas y datos representativos de OX-6, marcador de microglía. La microglía aumenta significativamente sólo en el grupo APP sometido a anestesia frente a los otros grupos. Los valores se expresan como la media \pm SEM (Figura B: n = 15-30; Figura C y D: n = 5). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido de test "Newman-Keuls". * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs Control anestesia; + $p < 0.05$, +++ $p < 0.001$ vs equivalente WT. El análisis mediante Anova de dos vías mostró interacción entre genotipo y tratamiento $F(1,19) = 17.99$, con una $p = 0.0004$ en la figura 16C.

La valoración del efecto de la anestesia en los 4 grupos experimentales mediante un anticuerpo anti-GFAP y técnicas de WB arrojó resultados similares (Figura 31C), mostrando una disminución significativa en los APP_{swe} con anestesia, mientras que WT con anestesia y APP_{swe} controles mostraron un aumento versus WT control. Además el análisis de dos vías muestra interacción entre el genotipo y tratamiento con isoflurano (Figura 31C), exponiendo un efecto sumatorio de ambas variables. Estos datos de gliosis

podrían explicarse con los resultados de muerte celular hallados en los 4 grupos (Figura 30).

También se estudió el estado de la activación microglial con el tratamiento con isoflurano, mediante WB con anti-OX-6 (Figura 31D). El grupo APP_{swe} tratado con isoflurano mostró un aumento de la microglía muy marcado respecto a los otros grupos, que no mostraron diferencias entre el grupo WT control y anestesia ni con el grupo APP_{swe} control. Estos datos sugieren que la microglía aumenta de manera sinérgica, específicamente solo con el genotipo APP_{swe} y el isoflurano.

En los ratones APP_{swe} nos encontraríamos en un punto en el que existiría una disminución de la glía neuroprotectora (astrocitos) y una activación de la glía inflamatoria (microglía) que podría producir muerte neuronal. Estos datos prueban que un tratamiento prolongado de isoflurano produce muerte neuronal, y la capacidad neuroprotectora de reacción glial se ve superada con las repeticiones a la exposición de isoflurano.

2.4 Acumulación de proteína tau y aumento de β -amiloide. Marcadores de patología Alzheimer

Para el estudio de la acumulación de las proteínas claves de la patología EA, tau y β -amiloide, se recurrió a WB e inmunohistoquímica, en el caso de tau, y a las técnicas de ELISA e inmunohistoquímica de placas de A β para el péptido amiloide.

Se utilizó anti-tau5 como marcador de la proteína tau total (Figura 32A), mostrando un ligero incremento de los grupos APP_{swe} frente a WT, sin diferencias significativas. La proteína fosforilada se considera un indicador más específico de la patología, ya que para que tau se acumule en ovillos neurofibrilares, característico en EA, necesita estar previamente fosforilada. Resultados similares a tau total se obtuvieron con la proteína tau fosforilada, aumento de P-Tau en ratones APP_{swe} frente a WT (Figura 32B), se percibió una tendencia no significativa debido al genotipo APP_{swe} frente a la línea WT, sin influencia de la anestesia.

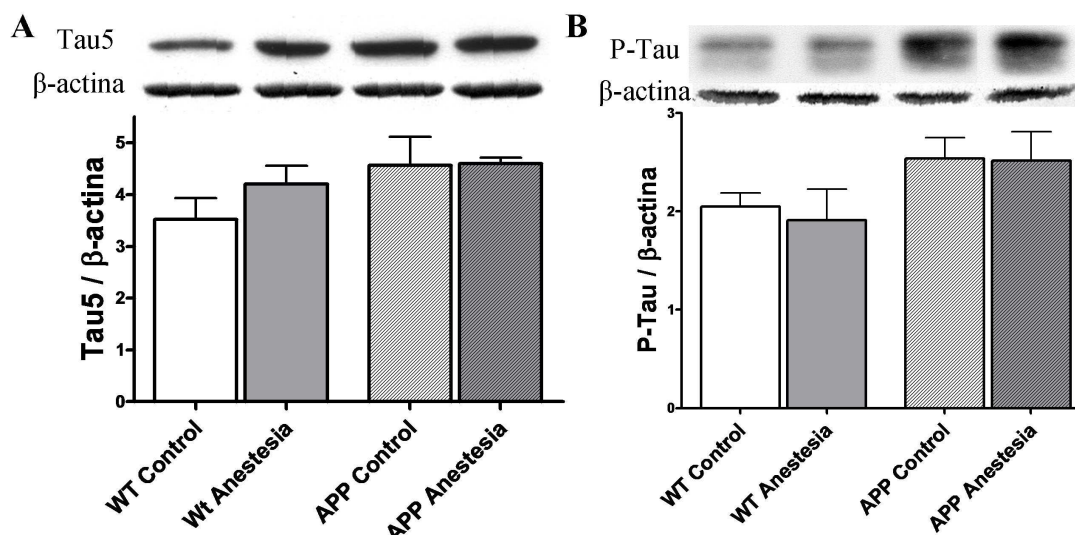


Figura 32. Efecto de la anestesia sobre la proteína tau, en niveles de proteína total y fosforilada. (A) Análisis de WB con anticuerpo anti-tau-5, marcador de proteína tau total. **(B)** WB de niveles de proteína tau fosforilada. Se observa una tendencia no significativa de los niveles de tau y P-tau por WB debido al genotipo APP.

Otro punto clave a estudiar era la acción de la anestesia sobre los niveles de péptido β-amiloide, en placas y soluble. Los contajes de placas de proteína acumulada (Figura 33A) en corteza mostraron resultados similares que los niveles de ELISA: soluble y total (Figura 33B). Los ratones APP tienen muy aumentados el número de placas frente a los WT, pero el tratamiento con isoflurano no aumenta su número (Figura 33A). Es importante, no solo medir el número de placas precipitadas de la proteína, sino también la concentración de Aβ soluble, que se postula como el factor clave en la toxicidad por amiloide. De manera similar a los resultados de placas las cantidades de amiloide soluble y total se muestran sin cambios por el tratamiento con isoflurano.

Sin embargo, al estudiar la expresión del fragmento Aβ encontramos un aumento significativo en el grupo APP_{swe} tratado con anestesia respecto a los demás grupos experimentales (Figura 33C) y un aumento sinérgico (interacción $F(1,18) = 4.56$) producido por genotipo y exposición a isoflurano. La acumulación de agregados Aβ se incrementa tanto en ratones WT como APP_{swe} cuando se les somete a tratamiento repetido de isoflurano (interacción $F(1,17) = 8.15$), pero el aumento de agregados en el grupo APP_{swe} con isoflurano es estadísticamente mayor que en el WT con isoflurano (Figura 33D).

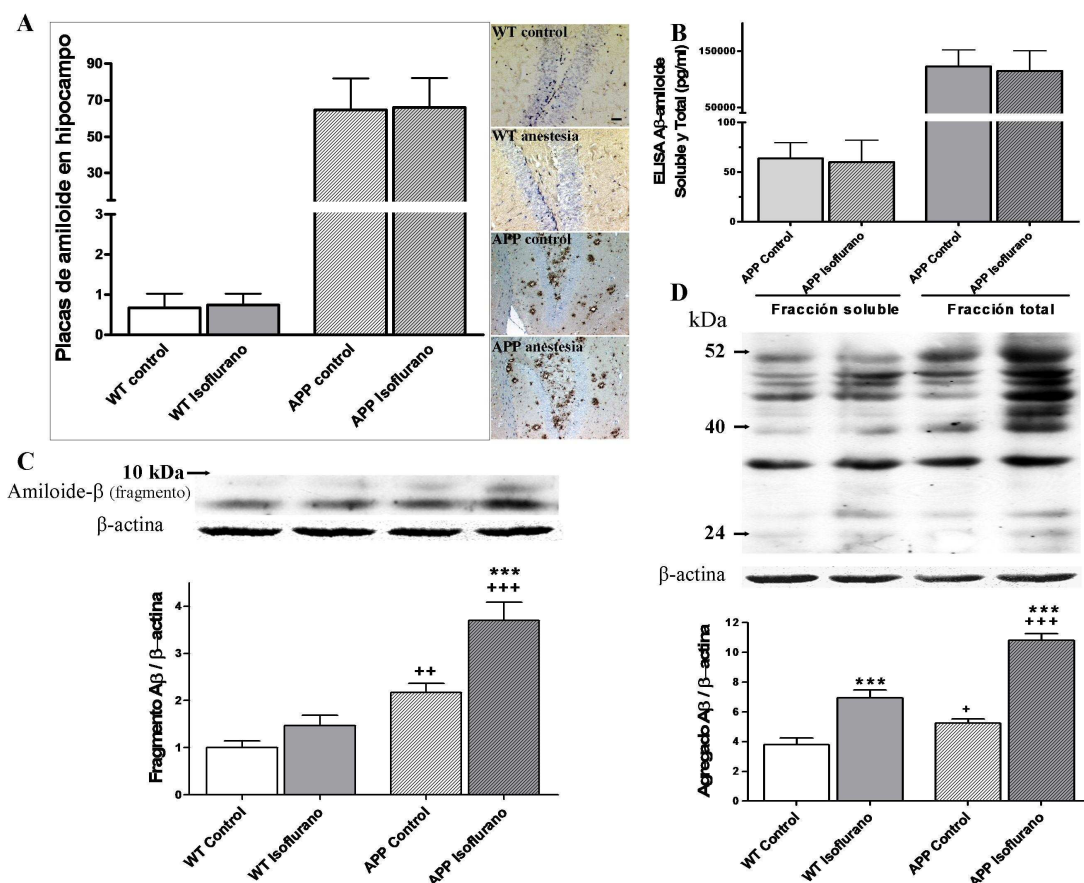


Figura 33. Efecto de la anestesia sobre los niveles de proteína Aβ, acumulación de placas de β-amiloide y niveles de amiloide (soluble y total). (A) Inmunohistoquímica de β-amiloide: micrografías de corteza y conteo de placas. Los grupos APP muestran un aumento de número de placas respecto de WT, pero no hay diferencias con la anestesia. (B) Resultado de los niveles de amiloide soluble y total por ELISA. No hay diferencias con el tratamiento con isoflurano. (C) Bandas e histograma de fragmento de amiloide, aumento significativo con el APP y el tratamiento. (D) Histograma cuantificado del sumatorio de bandas de amiloide (AC 1-42) corregidos por actina. Los valores se expresan como la media ± SEM (Figura A y B: n = 15-30; Figura C y D: n = 5-6). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido de test "Newman-Keuls". ***p<0.001 vs Controles respectivos; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001 vs equivalentes WT. El análisis mediante Anova de dos vías mostró interacción entre genotipo e isoflurano F (1,18) = 4.56 con un valor de p = 0.0467 en la figura 18C y F(1,17) = 8.15 y un p valor de 0.011 en la 18D.

2.5 Efecto del isoflurano sobre la expresión de chaperonas y autofagia

En las enfermedades neurodegenerativas existe un patrón de acumulación anómala de proteínas, esta acumulación esta relacionada con errores en el plegamiento y degradación. Los mecanismos implicados en la acumulación de proteínas anormales y que pueden actuar como agentes compensadores son: la actividad del proteosoma, la expresión de chaperonas y la autofagia.

La proteína CHIP es una 3-ubiquitin ligasa que marca proteínas para su degradación mediante el proteosoma, CHIP junto con HSP70 reacciona frente a niveles de estrés celular. Los ratones APP_{swe} sometidos a tratamiento con

anestesia no son capaces de incrementar la expresión de CHIP, como ocurre en los WT (Figura 34B).

HSP70 solamente aumenta en el grupo APP con anestesia respecto del resto de grupos experimentales (Figura 34A). En este caso la disminución significativa de CHIP con la anestesia podría deberse a una saturación frente a una mayor neurodegeneración ó aumento de estrés celular por el isoflurano. Este aumento del estrés se confirma con el incremento de HSP70, proteína de respuesta al estrés ("Heat Shock Protein"), en APP_{swe} con anestesia.

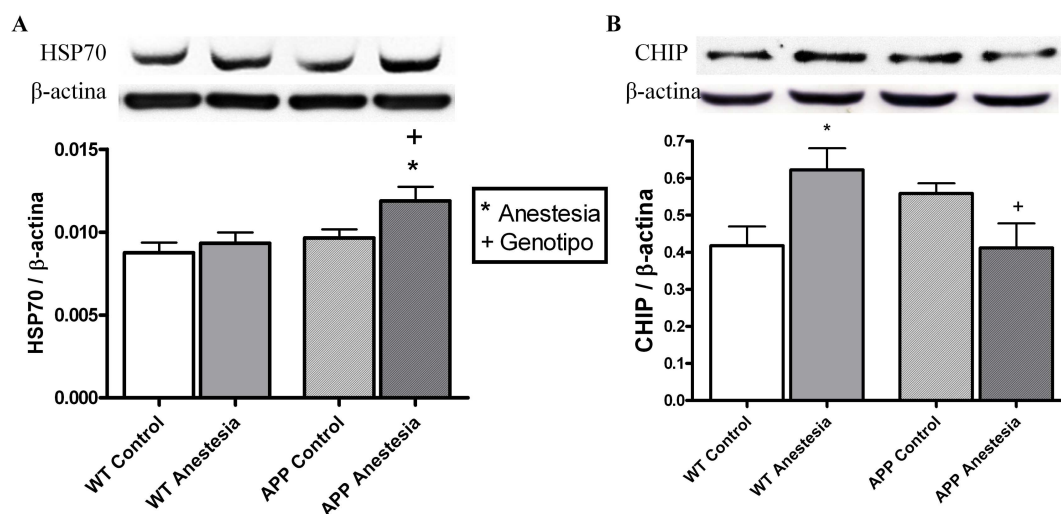


Figura 34. Expresiones de chaperona HSP-70 y CHIP. (A) Expresión de la chaperona HSP-70, se observa un aumento significativo de APP Anestesia frente a APP control y WT Anestesia. HSP-70 es una proteína de respuesta a estrés. **(B)** Respuesta de CHIP, se observa un aumento significativo en WT Anestesia, pero una disminución del grupo APP en respuesta a anestesia. Los valores se expresan como la media \pm SEM (Figura A: n = 8-12; Figura B: n = 8-12). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido de test "Newman-Keuls". *p<0.05 vs Control anestesia; +p<0.05 vs equivalente WT.

Otro sistema de defensa frente a la acumulación anómala de proteínas, además del proteosoma, es la autofagia. La autofagia es el proceso por el cuál se producen lisosomas que degradan aquellos productos anómalos, proteínas incluidas. Para el estudio de los procesos de autofagia se utilizaron los marcadores proteicos p62 y LC3 (I y II), de macro y micro-autofagia, respectivamente, estudiando su expresión mediante técnicas de WB. El anticuerpo p62 es un sustrato de los procesos de autofagia y aumenta de manera significativa en los APP_{swe} con anestesia (Figura 35A). Este aumento pone de manifiesto una disminución de la autofagia en este grupo respecto de los demás. El dato de p62 se corrobora a su vez con LC3, que se considera un marcaje directo del flujo autofágico. La proteína LC3 se encuentra en los

microtubulos, (concretamente en la cadena ligera) la subforma LC3II esta relacionada directamente con el número de autofagosomas, mientras que LC3I sería la forma "inactiva". Por ello el ratio LC3II/LC3I daría una relación directa del flujo autofágico, del paso de la forma I a la II. Este ratio disminuye de manera drástica en el grupo APP_{swe} con anestesia frente a los WT y APP control (Figura 35B), lo cuál se podría explicar con una disminución de la autofagia, coincidiendo con p62 y dándole un papel clave al tratamiento experimental con isoflurano en los ratones APP_{swe} para la disminución del flujo autofágico y la acumulación de proteínas anormales en los ratones APP_{swe} sometidos a tratamiento con isoflurano. Esta reacción diferencial entre los genotipos y la anestesia es estadísticamente significativa con el análisis de dos vías, mostrando interacción ($p = 0.0014$) entre genotipo y anestesia.

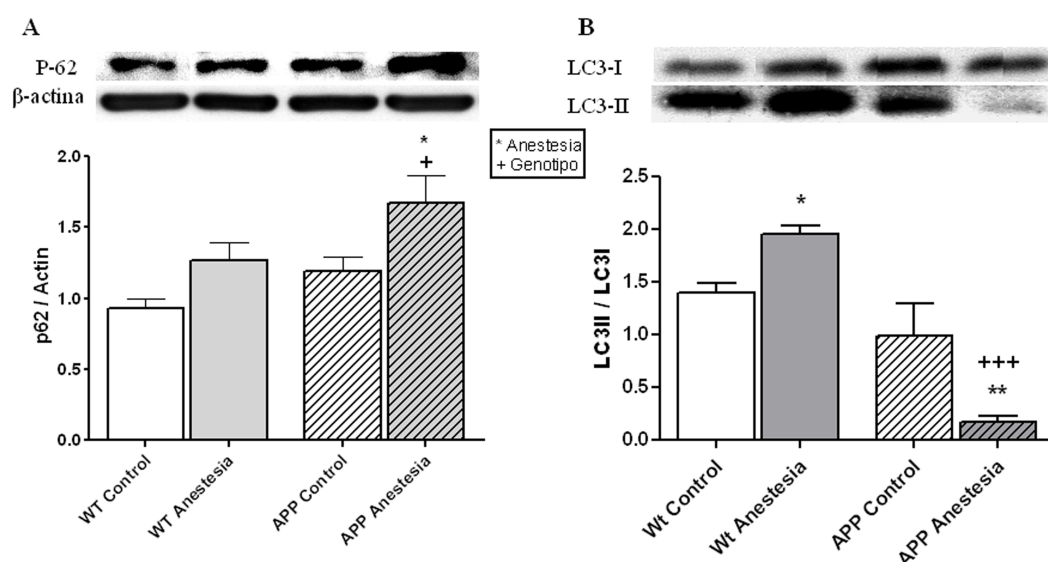


Figura 35. Niveles de marcadores de autofagia: p62 y LC3. (A) Expresión de p62 como sustrato de la autofagia. Su aumento en "APP Anestesia" parece mostrar una disminución de la autofagia frente a los demás grupos. **(B)** El ratio LC3II/LC3I es un marcador directo del flujo autofágico. Se observa una disminución muy significativa en APP Anestesia en concordancia con los datos de p62, parece sugerir una disminución de autofagia en APP anestesia, por el contrario en WT anestesia, curiosamente el isoflurano produce un aumento de la misma. Los valores se expresan como la media \pm SEM (Figura A: $n = 8-14$; Figura B: $n = 8-14$). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido de test "Newman-Keuls". * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Control anestesia; + $p < 0.05$, +++ $p < 0.001$ vs correspondiente WT. El análisis de 2 vías se realizó sobre los datos de la figura 20B, mostró una interacción entre las variables, genotipo APP y tratamiento con isoflurano, de $F(1.18) = 14.11$, con una $p = 0.0014$.

III. TRATAMIENTO AGUDO CON ISOFLURANO Y NEUROPROTECCIÓN CON TREHALOSA EN UN MODELO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Demostrada la mayor susceptibilidad de los ratones APP_{swe} frente a un proceso acumulativo de anestesia se decidió abordar un experimento agudo. Los ratones APP_{swe} sufren una mayor degeneración, y tras 3 meses de tratamiento con isoflurano se observa una pérdida de los sistemas de compensación, ¿pero que ocurre con tratamientos menos prolongados?

Para contestar esta pregunta se diseñó un modelo experimental en el que la aplicación de la anestesia estaba reducida en tiempo y número de exposiciones. El tratamiento se aplicó en una semana, 3 intervenciones de 1 hora y media cada una, con una reducción del porcentaje de isoflurano (de 2% en el modelo crónico, a 1% en el modelo agudo) para poder aumentar el tiempo de exposición. Se comprobó que este tratamiento con isoflurano producía alteraciones bioquímicas, moleculares y variaciones en la conducta en los ratones APP_{swe}.

Una vez comprobada la validez experimental del modelo agudo y un aumento de la muerte celular por apoptosis se realizó un pretratamiento con trehalosa, con la intención de proteger de los efectos de la anestesia. La trehalosa es un disacárido con bajo poder edulcorante. Es el azúcar mayoritario de los invertebrados, se encuentra en la hemolinfa de los insectos por su alta capacidad energética (de su hidrólisis se obtienen dos moléculas de glucosa), en hongos, setas y diversidad de plantas por su capacidad protectora de estructuras ante la desecación. En el reino fungi es responsable del "resurgir" estacional, gracias a su capacidad protectora de estructuras y proteínas y la capacidad de rehidratación que otorga. Además se encuentra presente en tardígrados, permitiendo detener el metabolismo en ambientes hostiles, lo que se conoce como criptobiosis.

En los últimos tiempos debido a su capacidad de actuar como chaperona química, protección estructural de proteínas, su función como inductora de la autofagia, el bajo coste de su producción y nulos efectos secundarios se la ha

propuesto como tratamiento en diversas enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la acumulación de proteínas aberrantes.

3.1 Administración de trehalosa e índice mnemónico durante el tratamiento con isoflurano

La trehalosa se administró en la bebida de los ratones durante una semana antes del inicio del tratamiento y la semana durante la aplicación del isoflurano. Se diluyó en la bebida al 1% con la intención de no alterar la ingestión de líquido por parte de los ratones, se mantuvo un control diario de la ingesta nutricional (Figura 36A y B). Como se observa, no se produjeron variaciones en la conducta alimentaria de los ratones, ni en la ingesta de líquido.

Se realizaron pruebas de conducta para ver la variación en la memoria de trabajo usando el laberinto en Y, 24 horas después de la última exposición a isoflurano (previo al sacrificio). En el número de entradas, índice de actividad exploratoria (Figura 36C) se observa un aumento no significativo en ambos grupos tratados con trehalosa, no se produce bajada en el rendimiento con el tratamiento agudo de isoflurano. En el índice de alternancia, como indicativo de memoria en trabajo, no se produjeron diferencias ni por el tratamiento con isoflurano, ni con la combinación con trehalosa (Figura 36D).

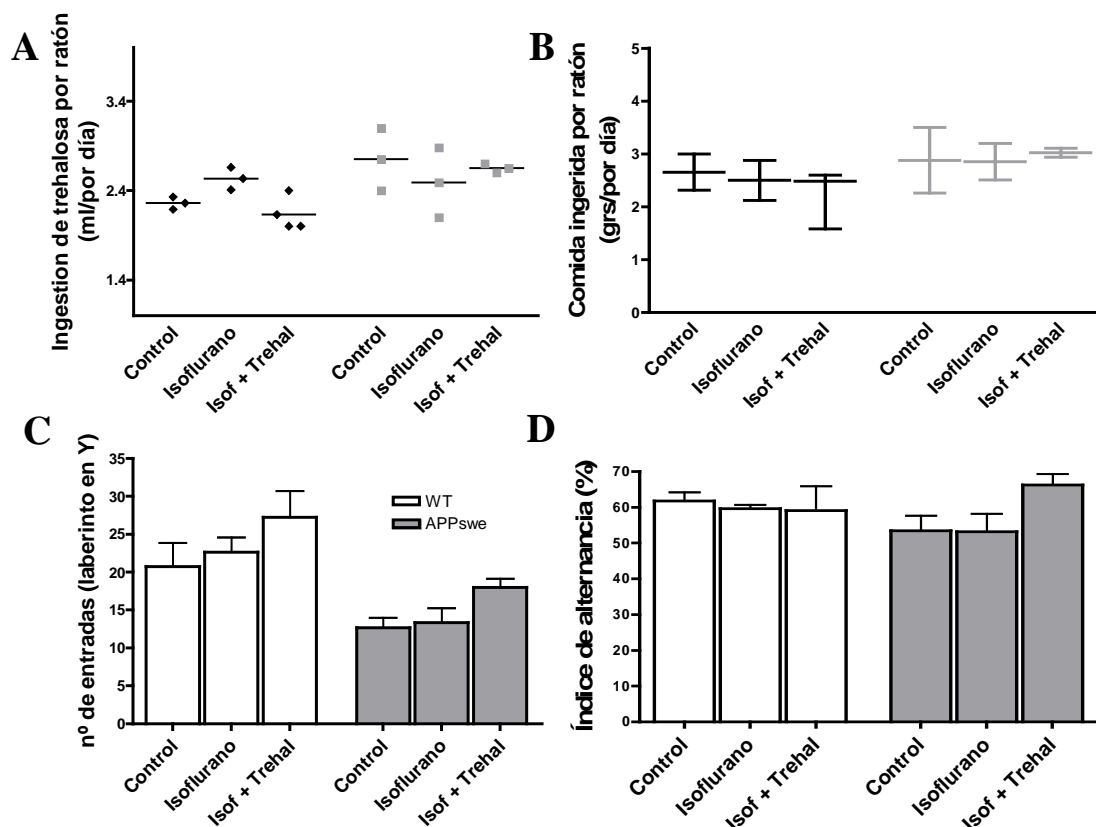


Figura 36. Control de ingesta y administración de trehalosa e índice de memoria. (A) Administración de trehalosa por ratón en el agua de bebida al 1%. (B) Ingesta de comida durante el proceso, sin variaciones entre grupos. (C) Número de entradas en el laberinto en Y en 5 minutos y (D) % de alternaciones espontáneas durante el análisis.

3.2 La trehalosa reduce la apoptosis inducida por tratamiento agudo con isoflurano

Para probar la validez del modelo experimental se comprobó el efecto de la exposición aguda de isoflurano en los animales de experimentación. Se realizaron cortes histológicos de los ratones de los 6 grupos experimentales y se analizó la muerte celular por apoptosis mediante la técnica TUNEL, marcándose aquellos núcleos en apoptosis final, con disgregación de cromatina (Figura 37A). Se cuantificaron los núcleos TUNEL+ en la corteza y el hipocampo y se comprobó un aumento significativo de las células apoptóticas en los grupos WT y APP_{swe} dependientes del tratamiento, así como una reversión de esta muerte en los animales pretratados con trehalosa (Figura 37B).

También se analizaron mediante WB el estado de expresión de las proteínas pro-apoptóticas, Bax y anti-apoptóticas, Bcl2, en un ratio "pro-

apoptótico": Bax / Bcl2. El resultado corroboró los resultados de la histología, mostrando en el grupo APP_{swe} un aumento muy significativo de la muerte con isoflurano a los 24 horas de la última exposición, así como una reversión de dicho ratio con la trehalosa (Figura 37C). El grupo WT tuvo una tendencia a subir no significativa en dicho ratio en WT con isoflurano pero permaneció sin cambios con el tratamiento combinado con la trehalosa y la anestesia.

Este aumento de la muerte por apoptosis en hipocampo y corteza junto con los cocientes de proteínas de muerte confirma que el diseño agudo del experimento influye en nuestros grupos de trabajo, especialmente en el modelo de EA.

Por otro lado la trehalosa disminuye la muerte inducida por isoflurano de manera significativa en los ratones APP_{swe}, confirmando su papel protector frente a la toxicidad por acumulación de proteínas anómalas, y revirtiendo la muerte hasta niveles basales; con una ingesta de trehalosa a baja concentración (1%), pretratados durante 1 semana y otra más durante las exposiciones a un agente potenciador de la toxicidad, el isoflurano.

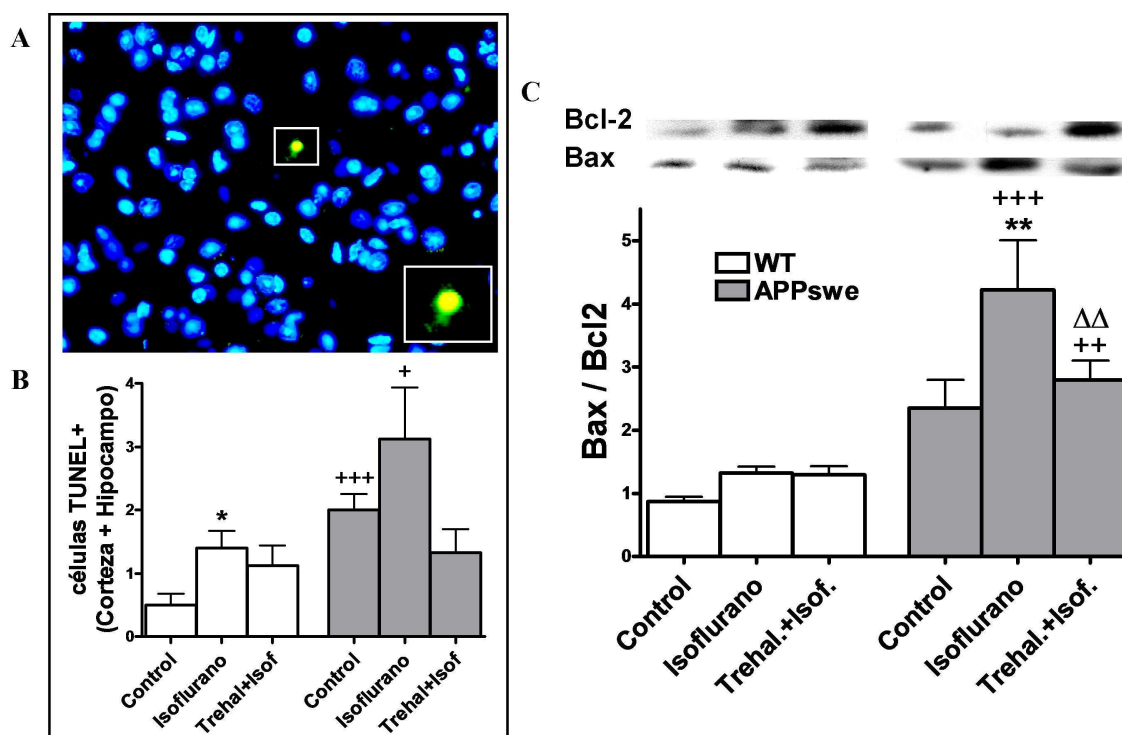


Figura 37. Análisis de la muerte por apoptosis en corteza e hipocampo de los ratones APP y WT con tratamiento agudo de isoflurano y pretratamiento con trehalosa como neuroprotector. (A) Microfotografía de una célula TUNEL+ en corteza. **(B)** Contaje de células TUNEL+ en corteza e

hipocampo. (C) WB representativo y cuantificación del ratio Bax / Bcl2 en todos los grupos de experimentación.

3.3 Gliosis en APP tras exposición aguda a isoflurano y reversión por tratamiento con trehalosa

Ya hemos visto en la figura 31 la reacción de la astrogliá ante el tratamiento crónico con isoflurano. En el se producía un aumento en WT con anestesia y una disminución en APP_{swe}. Este efecto se produce tras un tratamiento del 2% durante 3 meses de manera continuada, no obstante era importante saber qué reacción tendría la astrogliá en tratamientos más cortos.

Para ello realizamos una triple tinción con GFAP, Tau y Hoescht en los animales que recibieron tratamiento agudo con isoflurano, y con trehalosa (Figura 38A). Como se puede observar en la cuantificación en IODs la reacción de WT se mantiene, y aumenta la expresión de la astrogliá. En ratones APP_{swe} que recibieron tratamiento con isoflurano, durante 90 minutos x 3 veces a la semana, se observa un aumento de inmunotinción con GFAP. En ratones APP_{swe} observamos un aumento aún mayor con el tratamiento, en el caso de isoflurano agudo al 1% durante una semana, la reacción astrogliá no se ha visto saturada por la exposición continua durante un largo periodo de tiempo (Figura 31). Esta técnica también nos permitió ver expresión de astrogliá rodeando acúmulos tau positivos (Figura 38B), sobre todo en los ratones APP_{swe} sometidos a isoflurano, con mayor expresión de GFAP.

Además se observa como la administración de trehalosa revierte significativamente en ambos grupos, WT y APP, el incremento de astrogliosis inducido por el isoflurano.

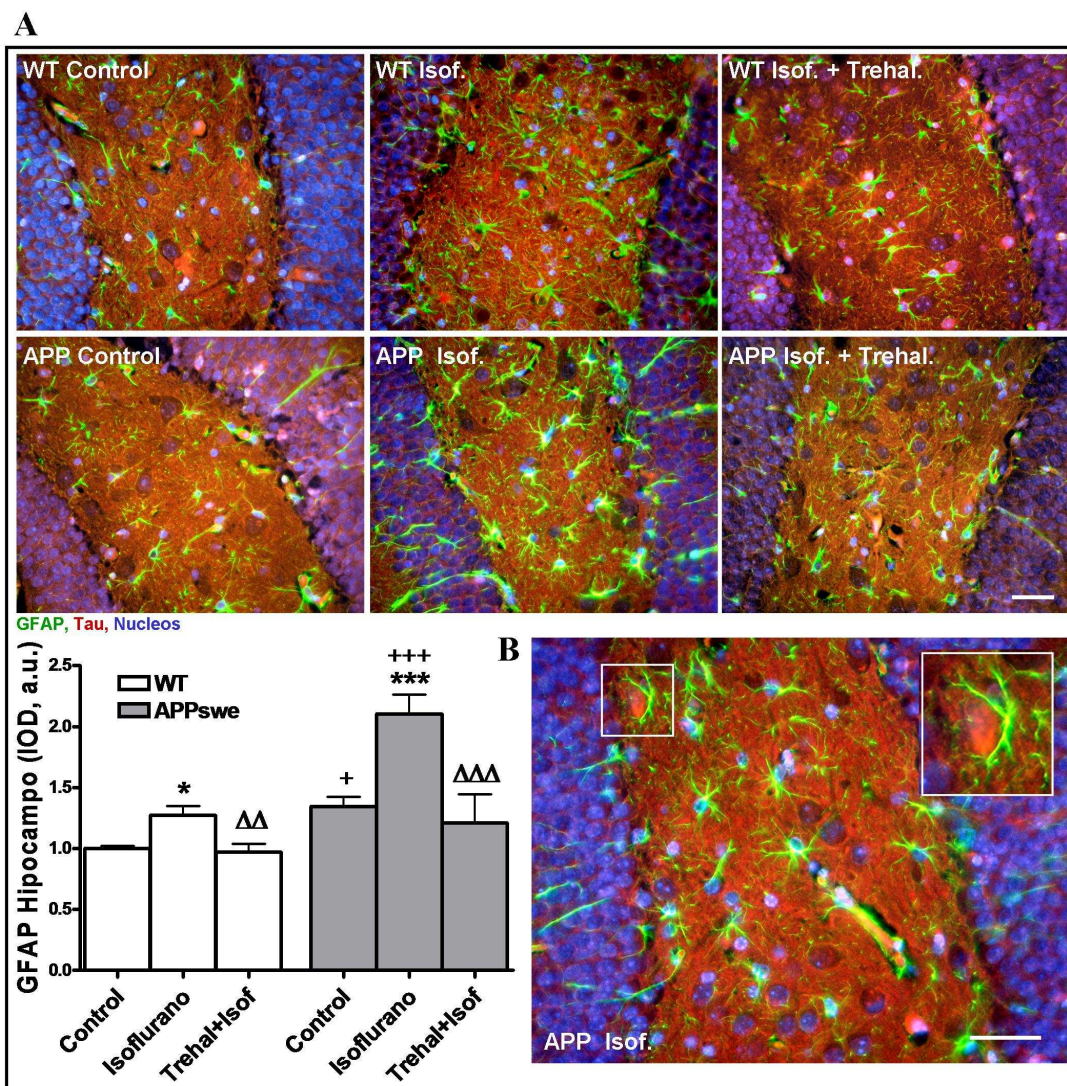


Figura 38. Valoración de astrogliá (GFAP positivo) en WT y APP con tratamiento agudo de isoflurano y neuroprotección con trehalosa. (A) Micrografías representativas de los 6 grupos experimentales con GFAP (verde), Hoescht (azul) y Tau (rojo) y cuantificación de GFAP mediante IODs en hipocampo. **(B)** Microfotografía de un APP con isoflurano, detalle de astrogliá rodeando un acumulo tau positivo. La astrogliosis aumenta significativamente en ambos grupos con tratamiento agudo de isoflurano y disminuye en los grupos tratados con trehalosa. Los valores se expresan como la media \pm SEM $n = 8-10$ de cada grupo experimental. Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido de test "Newman-Keuls", * $p < 0.05$ vs grupos control (WT ó APP); + $p < 0.05$, +++ $p < 0.001$ APP vs WT; $\Delta\Delta p < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta p < 0.001$ trehalosa+isoflurano vs isoflurano.

Esta expresión de GFAP se confirmó también mediante WB usando el anticuerpo anti-GFAP (Figura 39). La reducción de astrogliá es patente en ambas técnicas, por tanto parece que la trehalosa baja el nivel de gliosis, y por tanto disminuye la inflamación producida ante la aplicación de la anestesia.

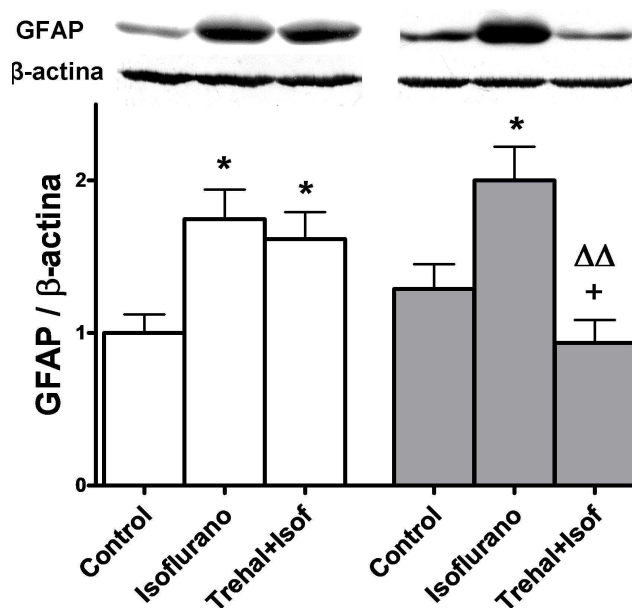


Figura 39. Expresión de GFAP corregido por β-actina en animales controles, con tratamiento agudo de isoflurano y pretratados con trehalosa. Los valores se expresan como la media ± SEM n = 5-8. Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido de test "Newman-Keuls": *p < 0.05 vs grupos control (WT ó APP); +p < 0.05 APP vs WT; ΔΔp < 0.01 trehalosa+isoflurano vs isoflurano.

3.4 Chaperona HSP70 y co-chaperona CHIP en isoflurano agudo y tratamiento con trehalosa.

Anteriormente hemos mencionado que la chaperona HSP70 aumenta por efecto del isoflurano en animales sometidos a anestesia durante 3 meses (Figura 34A).

Tras la aplicación aguda, durante una semana de isoflurano, por el contrario, la HSP70 aumenta en los dos grupos, WT y APP_{swe}. El co-tratamiento con la trehalosa normaliza los niveles de HSP70 en WT pero potencia la elevación inducida por isoflurano en los APP_{swe} (Figura 40A). La toxicidad diferencial que muestran los APP, mayor sensibilidad frente a anestesia general, frente a los WT, mayor resistencia, podría explicar estas diferencias.

Los niveles de CHIP no varían con la aplicación de la anestesia ni con el tratamiento con trehalosa en los WT. No obstante sí se ve un aumento de la expresión de CHIP de los ratones APP_{swe} ante la anestesia, y esta reacción aumenta aún más con la anestesia y la trehalosa (Figura 40B). Esta reacción diferencial entre los genotipos WT y APP_{swe} en CHIP, junto con los datos de HSP70 sugiere una respuesta diferente en los ratones APP_{swe} frente a WT.

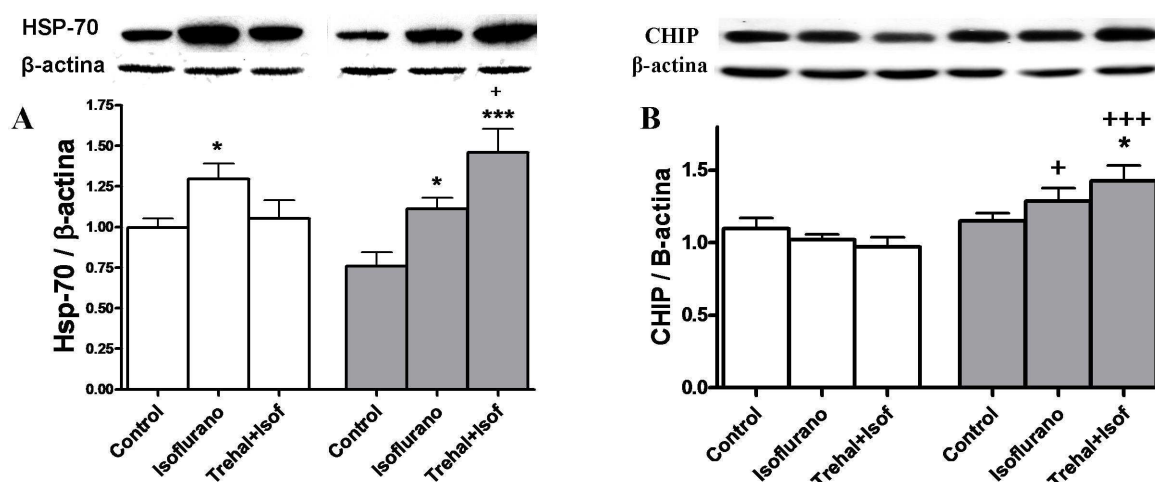


Figura 40. Expresión de chaperona Hsp70 y CHIP. (A) Expresión y cuantificación de la chaperona HSP70, aumenta en los grupos isoflurano, WT y APP, pero con la trehalosa disminuye en WT y aumenta en APP. (B) WB representativo e histograma de la co-chaperona CHIP, hay un aumento en APP, con anestesia y mayor aún sumando la trehalosa. Los valores se expresan como la media \pm SEM (Figura A: n = 10-17; Figura B: n = 7-10). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido de test "Newman-Keuls". * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs Control; + $p < 0.05$, +++ $p < 0.001$ APP vs WT.

3.5 Marcadores de autofagia en tratamiento agudo con isoflurano y pretratamiento con trehalosa

En la figura 35 hemos visto como la respuesta autofágica a la anestesia ya no reacciona frente al tratamiento crónico en los ratones APP_{swe} mientras que dicha reacción se mantiene en WT, visto con un marcador indirecto, p62 y uno directo como LC3. Por lo tanto era interesante observar el estado de la autofagia tras el tratamiento agudo de anestesia.

El tratamiento con isoflurano durante una semana no cambia los niveles de LC3II / LC3I (Figura 41A) aunque si los de Beclina-1 en los ratones WT (Figura 41B). En los ratones APP_{swe} el isoflurano eleva ambos parámetros con diferencias que estan en el límite de la significación. El pre-tratamiento con trehalosa potencia el efecto del isoflurano sobre ambos parámetros de autofagia en WT y en los APP_{swe}.

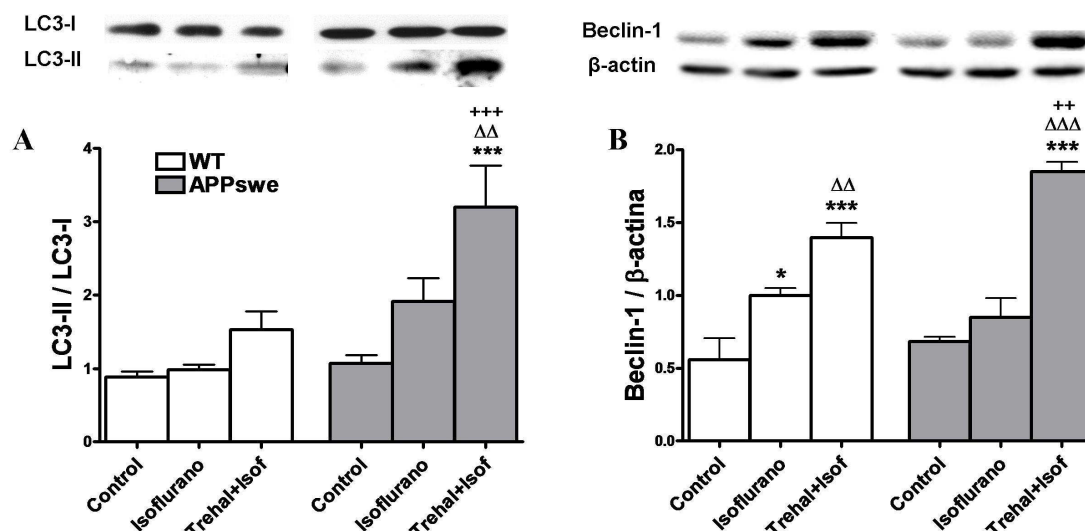


Figura 41. Marcadores directos de autofagia: cociente LC3II/LC3I y Beclina. (A) Imagen de WB representativa de LC3, bandas I y II, representación de cociente LC3II/LC3I. (B) Beclina corregida por β-actina en los 6 grupos de análisis, representa otro marcador de autofagia. Ambos marcadores muestran un aumento sinérgico, tanto por la exposición a Isoflurano agudo como por el tratamiento con trehalosa. La trehalosa es un activador de la actividad autofágica, existe un aumento de la autofagia muy exacerbado en los grupos con anestesia y trehalosa. Los valores se expresan como la media ± SEM (n = 10-17 en ambas figuras). Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido de test "Newman-Keuls". *p<0.05, ***p<0.001 vs respectivo control; ++p<0.01, +++p<0.001 APP vs WT; ΔΔp<0.01, ΔΔΔp<0.001 trehalosa+isoflurano vs isoflurano.

3.6 Efecto del tratamiento con isoflurano agudo y trehalosa en la acumulación de β-amiloide

En el tratamiento "crónico" observamos que no había diferencias en la proteína tau por WB (Figura 32), ni en placas de β-amiloide, ni en fracciones soluble y total por ELISA, pero sí una mayor acumulación de agregados Aβ (Figura 33).

En el tratamiento agudo observamos resultados parecidos, persisten las diferencias entre grupos APP_{swe} y WT en presencia de placas, APP_{swe} tiene una gran presencia mientras que WT prácticamente inexistentes (Figura 42A). En los análisis de las fracciones soluble (PBS + inhibidores) y total (fracción con guanidina) por ELISA (Figura 42B) se obtuvieron las diferencias esperadas intergrupos WT vs APP, pero no se observaron cambios por los tratamientos (isoflurano agudo y trehalosa).

No obstante, sí que se repitieron los cambios en la expresión de proteínas Aβ en WB. Con el anticuerpo específico contra fracciones Aβ (Figura 42C) a 20KDa se observaron, no solo diferencias entre basales de WT y APP_{swe}, sino un aumento por la exposición a isoflurano solo en los ratones APP_{swe} y una reversión significativa con el pre-tratamiento de trehalosa en APP

(Figura 42C). Esta disminución con la aplicación de trehalosa se repitió a 40KDa utilizando el mismo anticuerpo (Figura 42E).

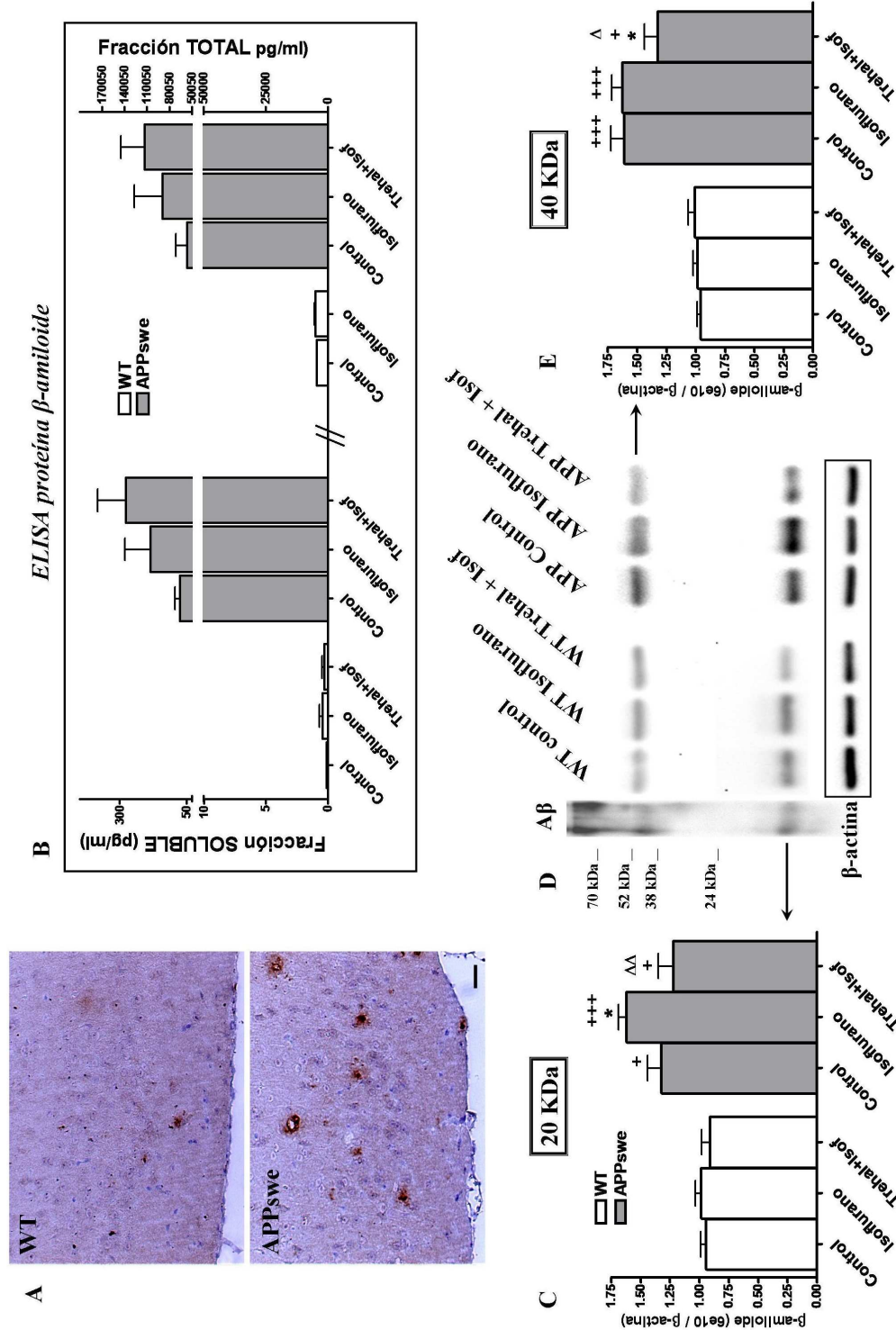


Figura 42. Efecto del tratamiento con isoflurano y trehalosa en la amiloidosis de los 6 grupos experimentales. La trehalosa disminuye la expresión de proteínas A β (por WB). (A) Imágenes representativas de ratones WT y APP. (B) Análisis de A β mediante ELISA en homogenizados de cerebro: fracciones soluble y total. Tanto las placas como el ELISA no muestran diferencias con los tratamientos, sólo las diferencias esperadas por genotipo WT vs APP. Los valores son una media representativa (n = 6-17 animales por grupo experimental). (C) Cuantificación de la banda de 20 KDa, (D) WB representativo y (E) cuantificación de la banda de 40 KDa con el anticuerpo anti-6E10 corregido por β -actina. Los efectos de la acumulación de A β se regulan a la baja con el tratamiento con trehalosa en los ratones (C y E). No se observaron diferencias en placas de amiloide en ELISA y placas, no obstante en WB el grupo APP aumentó los niveles de A β con isoflurano y reversionó con la aplicación trehalosa. Los valores de los WB son la media representativa de n = 9-17 animales. Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido de test "Newman-Keuls". *p < 0.05 vs grupos control (WT o APP); +p < 0.05, ++p < 0.01 APP vs WT; Δ p < 0.01 trehalosa+isoflurano vs isoflurano.

3.7 Patología tau tras exposición a isoflurano y pre-tratamiento con trehalosa

La exposición a isoflurano durante una semana aumenta la acumulación de tau, en lugares como hipocampo y corteza (Cuerno de Amón, figura 43A). Además, el número de ovillos en la totalidad del Cuerno de Amón aumenta el número de placas en APP_{swe} con exposición aguda a isoflurano. El pre-tratamiento con trehalosa revierte este fenómeno (Figura 43B).

La hiperfosforilación de tau se asocia a la acumulación de ovillos neurofibrilares y aumento de la toxicidad. El tratamiento con isoflurano aumenta este fenómeno y el tratamiento con trehalosa restituye los niveles controles (Figura 43C).

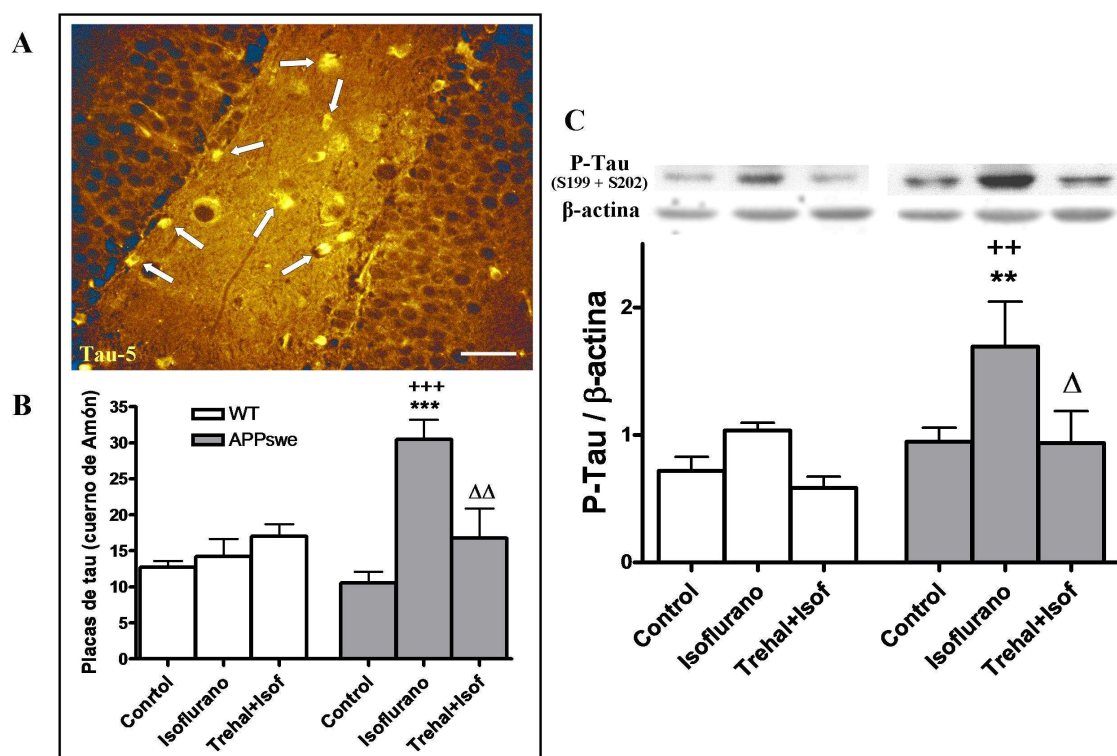


Figura 43. La trehalosa disminuye la patología tau en los ratones APP con tratamiento agudo de isoflurano. (A) Micrografía contrastada del cuerno de Amón, de un ratón APP con isoflurano marcado con anti-tau-5. Acumulaciones de tau señaladas en la imagen con flechas y cuantificadas en el cuerno de Amón (B). (C) Western blot y e histograma de tau fosforilada usando anti-p-tau (fosfo serina 199 + serina 202). Anticuerpo utilizado en la fracción total (tratada con guanidina). En ambas técnicas se confirma un aumento en el depósito y fosforilación de tau con el tratamiento de anestesia en los APP_{swe}, y una reversión de dicho efecto con la administración de trehalosa. Los valores de los WB son la media representativa de n = 12 animales. Análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía seguido de test "Newman-Keuls". **p<0.01, ***p<0.001 vs grupos control (WT o APP); ++p< 0.01, +++p< 0.001 APP vs sus correspondientes WT; Δp<0.05, ΔΔp< 0.01 Trehal+isof vs isoflurano.

VI- DISCUSIÓN

La historia nos enseña que la mayoría de los avances que han permitido controlar enfermedades mortíferas a lo largo de la historia no han caído del cielo ni han sido revelados a los hombres por intervención divina, ni siquiera, mal que nos pese, por descubrimientos científicos generados en los laboratorios más excelentes por los hombres más distinguidos.

Al contrario, el hecho de que la prevalencia de la tuberculosis en Nueva York disminuyera más entre 1930 y 1950, cuando mejoraron las condiciones de vida, que entre 1950 y 1970, cuando se descubrió la estreptomicina; o el hecho de que las enfermedades cardio- y cerebro-vasculares disminuyeran más en occidente como fruto del abandono del sedentarismo por encarecimiento del precio del petróleo que por el uso de estatinas, y otras paradojas que podríamos citar, nos llevan a concluir que si queremos progresar en el control de enfermedades tan terribles y prevalentes como la enfermedad de Alzheimer deberemos investigar los elementos que la modifican, tanto desde el punto de vista genético como ambiental, y sacar ventaja de la manipulación de estos elementos modificadores.

Esta tesis es fruto de ese intento de descubrir elementos genéticos y factores de riesgo adquiridos que pueden modular la patología Alzheimer en modelos transgénicos y aprovechar esos elementos para disminuir esa patología.

En esencia, lo que hemos descubierto es que, en contra a lo previsto, la anulación de parkina, una proteína que interviene en el procesamiento de proteínas alteradas, disminuye la patología Alzheimer en ratones transgénicos que expresan rasgos de esta enfermedad y que eso ocurre porque la deficiencia de activación de la vía ubiquitina proteosomal produce una estimulación de otro mecanismo alternativo de eliminación de proteínas anómalas, la autofagia. En segundo lugar hemos investigado el efecto de un agente que, según muchos estudios epidemiológicos, aumenta el riesgo de EA, la anestesia, y hemos demostrado que ese procedimiento, aumenta la mortalidad, las alteraciones cognitivas y la patología Alzheimer. Por último, hemos utilizado el modelo de la anestesia para demostrar que la activación farmacológica de la autofagia podría contrarrestar la patología.

I. ANULACIÓN PARCIAL Y TOTAL DE PARKINA EN UN MODELO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Debido a la agregación anómala de proteínas en las enfermedades neurodegenerativas, la posibilidad de elementos patogénicos comunes entre EA y EP ha sido y es objeto de estudio. De hecho, la EA y EP son enfermedades asociadas directamente con el envejecimiento, y el envejecimiento favorece la sobreproducción y formación de agregados proteicos que se ven en ambas enfermedades (Burns y cols., 2009). En el centro de los sistemas de degradación de estas proteínas esta la autofagia, las chaperonas moleculares (Boland y cols., 2008; Oddo y cols., 2008) y el UPS, un sistema directamente ligado a la patología Parkinson mediante, por ejemplo, la proteína parkina y su función de marcaje mediante ubiquitinización de proteínas para su degradación vía proteosoma (Favit y cols., 2000; Ardley y Robinson, 2004; Layfield y Shaw, 2007). Por otro lado, en la EA se considera clave la acumulación de una proteína, la APP (proteína precursora del β -amiloide), en fragmentos de A β que se depositan en forma de placas, a medida que la enfermedad progresa.

Hemos considerado interesante investigar el efecto que supondría la reducción de la actividad del proteosoma mediante la anulación de parkina, una E3-ubiquitin ligasa, en un sistema (APP_{swe}) que además sobreexpresa un exceso de acumulación de proteínas mal conformadas. Habíamos visto previamente que la anulación de parkina en un modelo de taupatía (tau^{vlw}) inducía la acumulación de amiloide, punto clave en la EA (Rodriguez-Navarro y cols., 2008), teniendo en cuenta estos resultados parecía lógico esperar un agravamiento de la patología Alzheimer en un modelo de ratón transgénico ante la misma anulación de parkina, parcial o total. Para ello cruzamos ratones APP_{swe} (Tg2576) con PK-KO hasta obtener dos líneas de ratones dobles mutantes: una de ellas con anulación parcial de parkina: APP_{swe}/PK+/- y otra con la anulación total de la misma, APP_{swe}/PK-/-. Para nuestra sorpresa los resultados divergieron totalmente de los esperados, la anulación del gen Park-2 en este modelo de EA no solo no agrava la patología sino que mejora los

síntomas en conducta y bioquímica en los dobles mutantes, además de reducir la agregación de las placas de β -amiloide en estos ratones.

Anulación parcial de parkina en APP_{swe}

Los ratones APP_{swe} tienen una pérdida de peso respecto de los controles WT (Hsiao y cols., 1996) pero curiosamente la hemizigosis de la proteína parkina produce una recuperación del peso a valores cercanos a los controles, tanto PK \pm como WT, además de una mejora en las deficiencias observadas en los APP_{swe} en el laberinto en Y. La supresión parcial de parkina disminuye el ratio de proteínas pro (Bax) y anti-apoptóticas (Bcl2) y la gliosis, reduce el número de placas en córtex e hipocampo y la acumulación de la proteína tau a los 12 y 16 meses de edad. Los mecanismos por los cuales se producen estos efectos pueden incluir la sobre-expresión de chaperonas, como HSP-70 y CHIP que apoyarían el correcto plegamiento de las proteínas, así como, la sustitución de la función de la parkina con CHIP como E3-ubiquitin ligasa (Murata y cols., 2001; Magrane y cols., 2004; Shin y cols., 2005). Además de un aumento de la autofagia como compensación a una menor actividad del UPS, a través de la activación de las proteínas LC3 y Beclina y la disminución del sustrato p62 (Geetha y Varalakshmi, 2001; Kuusisto y cols., 2002; Tanida y cols., 2005; Mizushima y Kuma, 2008; Pickford y cols., 2008).

Anulación total de la parkina

Una vez comprobado, en machos y hembras, que la anulación parcial provocaba mejoras en la patología de EA, se realizaron cruces para obtener animales homocigotos y poder estudiar el efecto de la ausencia total de la parkina, esperando quizá una saturación, ahora sí, de los sistemas de degradación y un mayor acumulo de proteínas anómalas. No obstante, una vez mas, los resultados mostraron en los ratones dobles transgénicos APP_{swe}/PK nulos para parkina, unas mejorías de la patología APP similares o superiores a las halladas con el grupo heterocigoto: mejora del comportamiento en estudios de conducta, en patología β -amiloide, en niveles de chaperonas y co-chaperonas y en marcadores de autofagia. Se halló una excepción en la longitud de la zancada, donde la patología "parkina" (anulación total de parkina) produce una reducción de la misma, considerada una akinesia presintomática

(Rodriguez-Navarro y cols., 2007), es decir, un signo de parkinsonismo subclínico característico de los ratones nulos para parkina.

Además de la recuperación del peso en los dobles mutantes las pruebas de comportamiento de las líneas de ratones aportaron datos muy interesantes. Uno de los efectos que se producen en la EP es lo que se llama "marcha propulsiva", en el que los pacientes tienden a acortar las zancada como mecanismo de equilibrio en su desplazamiento (http://www.diagnostico.com/CNS/Parkinson_3.stm). Con la intención de valorar el estado de los ratones en el fenotipo parkinsoniano se analizó en todas las líneas, y se observó como aquellas en las que la proteína parkina esta anulada totalmente esta disminución se mantenía ($APP_{swe}/PK^{-/-}$ y $PK^{-/-}$) pero no en la anulación parcial. Esto se podría explicar por la liberación anormal de neurotransmisor dopamina; en los $PK^{-/-}$ dicha liberación podría ser vesicular y menor que en los $PK^{+/-}$, donde podría haber una mayor reserva ó producción de neurotransmisor almacenado en el citosol (Itier y cols., 2003).

También son interesantes los resultados del laberinto en Y. La exploración de nuevos ambientes implica una enorme variedad de estructuras: hipocampo, tálamo, el córtex prefrontal, estriado, cerebelo y el sistema vestibular, además implica variedad de neurotransmisores como acetilcolina y dopamina. Por ello, se considera que la alteración espontánea en las exploraciones de laberinto, es un test sensible a los procesos patológicos del envejecimiento e índice de la memoria en trabajo (Lalonde, 2002; Jensen y cols., 2005; Mouri y cols., 2007). En nuestro modelo experimental observamos resultados de reducción en la actividad exploratoria en los ratones transgénicos (APP_{swe} , PK y APP_{swe}/PK), otros esperados como la reducción en el % de alteraciones espontáneas de los ratones APP_{swe} (Hsiao y cols., 1996; Chapman y cols., 1999), también dicha reducción desaparece en los ratones $APP_{swe}/PK^{+/-}$ y $APP_{swe}/PK^{-/-}$. Esta claro que los ratones transgénicos (APP_{swe} , PK y APP_{swe}/PK) sufren algún tipo de alteración en su método de exploración y memoria en trabajo, no obstante los dobles transgénicos, $APP_{swe}/PK^{+/-}$ y $APP_{swe}/PK^{-/-}$, muestran una mejor elección de sus exploraciones, mostrando pues una mejora de la patología (Perucho y cols. 2010).

La parkina y la amiloidogénesis

A pesar de que la acumulación de proteínas y la formación de placas y ovillos neurofibrilares siguen siendo centrales de la patología EA, los mecanismos celulares que se ven envueltos en esta acumulación de proteínas no se conocen plenamente (Bettens y cols., 2010; Simon y cols., 2010). Además, los déficits cognitivos no muestran relación directa con la carga de amiloide ni del número de placas seniles. Los factores comunes en las enfermedades neurodegenerativas son: la edad (Gruart y cols., 2008), la carga de tau (Avila, 2010) y la posible relación entre las proteínas A β y tau (Lewczuk y cols., 2004; Menendez y cols., 2006; Rodríguez-Navarro y cols., 2008; Hernandez y cols., 2010; Rodríguez-Navarro y cols., 2010).

La parkina es una proteína con capacidad ubiquitin-ligasa (Kitada y cols., 1998; Shimura y cols., 2000) y juega un papel en muchos otros procesos celulares importantes y en la estabilidad de las proteínas (Ciechanover y Brundin, 2003; Giasson y Lee, 2003; Moore y cols., 2003). En su papel de ubiquitin-ligasa, la parkina marcaría mediante adicción de ubiquitina a las proteínas mal conformadas para la degradación vía proteosoma. Se ha visto como ratones transgénicos para FAP (polineuropatología amiloidótica familiar), al disminuir los niveles de ubiquitinización, aumentan los acúmulos de α -sinucleína en comparación con ratones controles (Santos y cols., 2007). La parkina se ha implicado en promover la autofagia de las mitocondrias ante un funcionamiento deficiente (Narendra y cols., 2008), en neuroprotección contra toxinas mitocondriales y en la acumulación de β -amiloide en células musculares (Rosen y cols., 2006). El proteosoma está implicado en la degradación de los fragmentos terminales de A β (Skovronsky y cols., 2000; Nunan y cols., 2001; Nunan y cols., 2003), por lo que se considera que cualquier acción que estimule la función proteosomal, como la parkina, reduciría la acumulación de β -amiloide. No obstante también se han obtenido otros resultados, por ejemplo el bloqueo total del UPS con lactacisteína o mediante la inhibición de la ubiquitinización con Leucina-Alanina, previene de la toxicidad por amiloide en células neuronales corticales (Favitt y cols., 2000).

En la EA y EP el envejecimiento es probablemente el factor más decisivo y afecta a la función proteosomal y reduce la respuesta frente a estímulos y estrés oxidativo (Bulteau y cols., 2000; Keller y cols., 2000; Merker y cols., 2000). Este hecho indicaría que con el envejecimiento se produciría un aumento progresivo de la acumulación de amiloide debido a la reducción de la ubiquitinización, por lo que podemos asumir que la presencia de placas de amiloide y los aumentos de la fracción soluble, considerada tóxica, es dependiente de la edad.

En los ratones APP_{swe} mutantes la sobreexpresión de la proteína precursora hace que la acumulación se de principalmente en estos, pero en los dobles mutantes APP_{swe}/PK hetero y homocigotos hemos observado una menor acumulación de placas, además de una reducción de la cantidad de A β soluble en comparación con los APP_{swe}. Esta diferencia no es debida a diferentes niveles de expresión del inserto APP, ni a la cantidad de proteína A β presente. Estos efectos podrían ser relevantes en las mejoras de peso y pruebas de conducta orientadas a discernir efectos sobre la memoria de trabajo, donde se obtienen mejoras en el rendimiento frente a los APP_{swe}. Además, considerando el papel del UPS los ratones APP_{swe}/PK^{-/-} recuperan niveles de controles WT en actividades quimiotripsina y tripsina del proteosoma, mientras que los APP_{swe} muestran estos niveles disminuidos (Favit y cols., 2000; Forloni y cols., 2002).

Muerte celular y patología tau

Los ratones APP_{swe}, como modelo de EA, muestran niveles incrementados del cociente de proteínas pro / anti-apoptóticas (Bax/Bcl2), además de niveles aumentados de gliosis, de acúmulos y expresión de la proteína tau y su fosforilación frente a ratones WT. No obstante los dobles mutantes APP/PK tanto hetero como homocigoto normalizan los niveles de muerte celular en cortex e hipocampo, cociente Bax/Bcl2 y de gliosis (Perucho y cols. 2010). En la EA se relaciona directamente el aumento de A β con la posterior fosforilación de tau, lo que impide la unión correcta de tau a los microtúbulos y facilita su acumulación (Avila y cols., 2004a; Avila y cols., 2004b; Perez y Palmiter, 2005).

La teoría de la cascada de amiloidosis considera el depósito de A β previa a la acumulación de tau, en la muerte neuronal y la pérdida sináptica (LeBlanc, 2005; Golde y cols., 2006); la activación de caspasas podría ser la unión entre estos tres eventos. Además, se ha comprobado como una familia de proteínas con capacidad anti-apoptótica como Bcl-2 previene la acumulación de tau vía inactivación de las caspasas 3 y 9, en un modelo transgenico triple de EA (3xTg-AD) sobreexpresando Bcl-2 (Rohn y cols., 2008). En nuestro modelo experimental observamos como no solamente se da un aumento de las proteínas pro-apoptóticas (Bax) en el modelo de APP_{SWE} sino que en los dobles mutantes APP_{SWE}/PK homo y hetero aumenta el Bcl-2 y disminuye por tanto el cociente pro/anti apoptosis. No obstante, no se puede contemplar un aumento de la expresión de la familia Bcl-2 como tratamiento a la toxicidad en este tipo de enfermedades por sí solo, ya que se han visto otros papeles de esta familia, y no se puede eliminar la apoptosis de manera general ya que entrañaría riesgos y podría originar tumores o efectos secundarios desconocidos (Rohn y cols., 2008). No se puede basar la recuperación de APP/PK solo en Bcl-2, también juegan un papel importante el bloqueo o reducción de la acumulación de amiloide, posiblemente vía HSP70, CHIP y el aumento de autofagia, apoyarían la reducción de la patología (Oddo y cols., 2008; Cherra y cols., 2010; Moreira y cols., 2010).

Se considera que existe una relación más directa de la patología tau con la neurodegeneración en los pacientes de EA. Varios trabajos *in vivo* apoyan el papel del amiloide como precursor ó iniciador de la acumulación de tau. Se ha visto que la inyección de amiloide en el cerebro de animales transgénicos en tau (P301L) y dobles mutantes APP y tau (Tg2576 y JNPL3) ven exacerbada su taupatía por acción de la proteína amiloide (Gotz y cols., 2001; Lewis y cols., 2001). También se produce una reducción de los niveles de la proteína tau, al utilizar anticuerpos específicos contra el fragmento β -amiloide (Oddo y cols., 2004), además, las fracciones solubles de A β y tau forman complejos que promueven la autoagregación de ambas proteínas (Guo y cols., 2006). En algunos estudios *in vivo* la relación entre ambas proteínas no tiene duda, aunque sus influencias entre ellas se mantiene en controversia. En un modelo murino transgénico de A β el aumento genético de tau (3xTg-AD) no produce variación

en la patología de A β (Oddo y cols., 2006; Oddo y cols., 2007), pero reducir la cantidad de tau endógena sí disminuye los déficits cognitivos en un modelo de EA (Roberson y cols., 2007).

Además de la relación entre estas proteínas también se ha visto como la α -sinucleína (proteína de acumulación en EP) también induce la formación de fibrillas de tau y ambas aumentan de manera sinérgica la aparición de patología amiloide (Giasson y cols., 2003). En nuestro laboratorio también hemos estudiado como en un modelo de taupatía junto con la anulación total de la proteína parkina (PK^{-/-} / Tau^{vlw}), manifiesta un aumento de la acumulación de β -amiloide sin la intervención directa de genes o proteínas relacionadas con APP o A β (Rodríguez-Navarro y cols., 2008; Mena y cols., 2009).

Considerando la directa relación descrita de taupatía y EA, en nuestros resultados encontramos que el aumento del depósito de tau en ratones APP_{swe} versus WT es revertido en los dobles mutantes APP_{swe}/PK. Además observamos unos menores niveles de proteína tau total y tau fosforilada en los dobles mutantes APP_{swe}/PK^{+/-} frente a APP_{swe} y WT. Se confirma por tanto que la reducción en patología A β y tau conseguida en estos ratones, repercute en una reducción en la muerte neuronal, reducción de la gliosis y de la agregación final de ambas proteínas (Perucho y cols., 2010).

La gliosis y la influencia de la parkina en la patología de EA

La neuroinflamación es un fenómeno al que cada día se le da más importancia en la EA. Por la acumulación de A β se considera que hay una respuesta caracterizada por microglía activada y astrocitos reactivos. La acumulación temprana de la microglía parece retrasar la patología de la EA (Simard y Rivest, 2006a), pero mientras progresa la enfermedad, la microglía se acumula de manera paralela a la enfermedad, (Dickson, 1999; Mott y Hulette, 2005) y pierde su capacidad neuroprotectora pero mantiene la capacidad de liberación de moléculas inflamatorias. Las citoquinas segregadas además de disminuir la acción de degradación del A β , TNF- α e interferón- γ aumentan la expresión de BACE1, enzima de corte de APP, aumentando la producción de fragmentos de A β (Liao y Wang, 2004; Yamamoto y cols., 2007).

Esta permutación se hipotetiza que puede ser por un cambio de la reacción de la glía frente a la agresión que produce el A β . A tiempos tempranos y por expresión de IL-4 (Iribarren y cols., 2005; Ponomarev y cols., 2007) en la astrogliá, la microglía presentaría una forma "alternativa" que no expresaría factores inflamatorios y sí "alternativos" (YM-1 y Arg-1) potenciando la neuroprotección (Edwards 2006). Este fenotipo se mantendría en las células que están en contacto directo con las placas, pero coexistiría en etapas tardías y avanzadas con el fenotipo "clásico" de la microglía donde sí se expresan los factores neuroinflamatorios.

En nuestro modelo experimental, se observa una reacción de GFAP, astrogliá reactiva, mayor en los ratones APP_{swe} frente a controles WT y vemos una reducción de la expresión tanto en inmunohistoquímica como en Western Blot en los dobles mutantes APP_{swe}/PK+/- . Dicho aumento en APP_{swe} puede ser interpretado de maneras distintas:

1) Podríamos considerar que los 12 meses de edad de los ratones aún no es una etapa de senilidad avanzada, aparecen las placas de amiloide, aunque con diferente carga en los ratones APP_{swe}, y que por ello la reacción de la astrogliá significaría mayor reacción de neuroprotección, activando la forma "alternativa" de la microglía mediante IL-4, frente a una agresión vía A β . En este caso consideraríamos que dicha agresión se ve claramente reducida en los dobles mutantes, es decir que concordaría con los datos aportados de menor número de placas y de amiloide soluble vistos en estos ratones, al tener menos respuesta deducimos una menor agresión en los dobles APP_{swe}/PK.

2) Si pensamos en los 12 meses como un estado de senilidad avanzada en estos ratones, y por tanto de mayor respuesta "clásica" de la microglía, la reacción astrogliá podría reflejar un estado de neuroinflamación mayor en los APP_{swe} (mayores niveles de GFAP) que en los dobles mutantes APP_{swe}/PK+/-, lo que conllevaría a una menor toxicidad en APP_{swe}/PK+/-.

Considerando los datos obtenidos sobre la acción de la anulación parcial de parkina en ratones APP_{swe} ambas interpretaciones nos ofrecen la misma conclusión, la anulación parcial de la parkina induce:

1) Una reducción de la toxicidad del amiloide (menor número de placas y de amiloide soluble) y por tanto una menor agresión en los dobles mutantes por una menor reacción de la glía alternativa y un estado de menor toxicidad en los APP_{swe}/PK (tanto homo como hetero).

2) O una menor toxicidad por una menor neuroinflamación por reducción de la reacción glial clásica. Las dos posibilidades cuadran con la menor muerte en los dobles mutantes y la reacción antes mencionada de sistemas de compensación en chaperonas y autofagia.

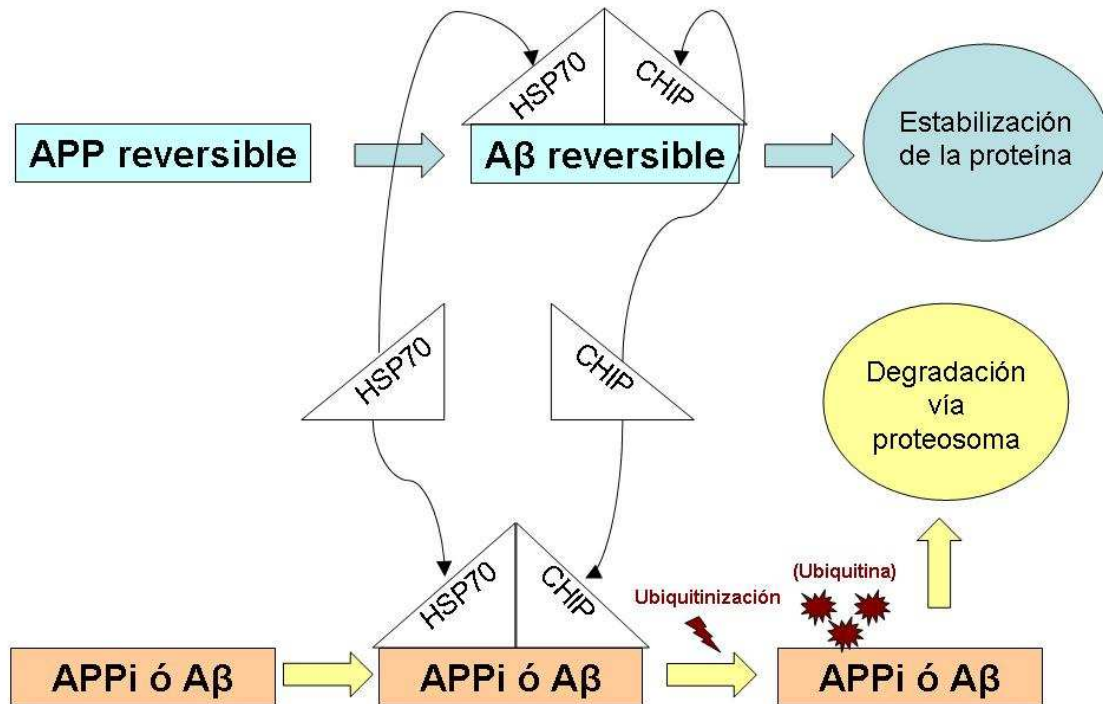
Mecanismos de compensación ante la deficiencia de parkina

Todos los datos apuntan a una patología EA multifactorial, en nuestro caso la mejoría de los ratones dobles mutantes tiene que tener más factores que una compensación en la actividad del UPS. Encontramos que los ratones APP_{swe}/PK tienen mayores niveles de HSP70, CHIP, Beclina y cociente LC3II/LC3I, así como menores niveles de p62 como sustrato de autofagia, que los ratones APP_{swe}, sugiriendo una sobreexpresión de chaperonas, co-chaperonas y la actuación de la autofagia en los dobles mutantes, que podrían compensar el fenotipo APP_{swe}.

CHIP es una E3-ubiquitin ligasa que además de actuar como parkina, apoyando la degradación vía proteosoma, actúa en conjunto de HSP70 interaccionando con el amiloide e influyendo sobre su metabolismo (Murata y cols., 2001; Sahara y cols., 2005; Shin y cols., 2005; Kumar y cols., 2007). CHIP facilita la eliminación del A β (1-42) y protege contra su toxicidad (Kumar y cols., 2007). De hecho el acrónimo CHIP proviene de su relación con las HSPs: "Proteína de Interacción con Hsp en fragmento C-terminal". CHIP no solo aumenta la expresión de HSP70 durante el estrés agudo sino que también lo regula en la recuperación del mismo hasta niveles basales de la chaperona (Qian y cols., 2006). Además se ha demostrado una relación inversamente proporcional a HSP70 y la agregación de tau (Ansar y cols., 2007; Rodríguez-Navarro y cols., 2007) probándose a CHIP como una llave molecular entre el A β y la patología tau (Oddo y cols., 2008). Además se ha observado previamente como la inhibición del sistema de ubiquitinización implica un

aumento de CHIP y HSP70 (Kumar y cols., 2007) y la doble acción de CHIP como E-3 ubiquitin ligasa y co-chaperona interactuando con HSP70 disminuye la acumulación de A β y tau fosforilada (Hatakeyama y cols., 2004b; Petrucelli y cols., 2004; Sahara y cols., 2005; Kumar y cols., 2007).

CHIP como CO-CHAPERONA estabilizando la proteína malformada



CHIP como ubiquitin-ligasa para degradación vía proteosoma

Figura 44. Esquema de la doble función de CHIP en la degradación de APP y A β en citoplasma. CHIP actúa como co-chaperona con HSP-70 en el correcto plegamiento de la proteína mal conformada APP (parte superior, azul). CHIP no obstante también puede interactuar como E3-ubiquitin ligasa para unir monómeros de ubiquitina para la degradación proteosómica de la APP truncada o irreversible (APPi) ó el A β soluble.

La interacción entre las proteínas tau y parkina se ha demostrado en modelos celulares sobreexpresando ambas proteínas (Shimura y cols., 2004). La ubiquitinización de tau *in vitro* se ha conseguido con el complejo CHIP-HSP70 pero no con las proteínas parkina (Hatakeyama y cols., 2004a; Petrucelli y cols., 2004; Shimura y cols., 2004). Además HSP70 y CHIP regulan la actividad E3-ubiquitin ligasa (Imai y cols., 2002) y la falta de parkina agrava el fenotipo de un modelo *in vivo* expresando tau humana (Menendez y cols., 2006; Rodríguez-Navarro y cols., 2008). Encontramos que CHIP/HSP70, un complejo que ubiquitina la tau fosforilada y aumenta la supervivencia celular, está aumentada en los ratones APP_{swe}/PK+/- y APP_{swe}/PK-/- . Como prueba de esto el ratio Bax/Bcl2 y el número de células TUNEL+ está disminuido en los

animales dobles transgénicos en comparación con los simples APP_{swe}. HSP70 también se ha visto que por sí sola tiene acción neuroprotectora en modelos de neurodegeneración por amiloide en cultivos primarios neuronales (Magrane y cols., 2004).

CHIP por tanto apoyaría la recuperación de los niveles basales de los ratones dobles mutantes supliendo en parte la acción de la parkina como ubiquitin ligasa y regulando al alza en estos ratones la actividad de HSP70 como co-chaperona.

La autofagia es otro de los caminos de degradación como mecanismo de defensa frente a proteínas demasiado grandes para su degradación vía UPS, además la autofagia juega un papel fundamental en equilibrio inverso con la apoptosis celular en situaciones de estrés (Moretti y cols., 2007). Encontramos que los APP_{swe}/PK ven aumentado su flujo autofágico en comparación con los ratones APP_{swe}; Este aumento se confirma por cuatro marcadores distintos: LC3, p62, la Beclina y la proteína autofagosómica Atg-8 (Bergamini y cols., 2007).

LC3 se utiliza ampliamente para la monitorización de la autofagia, se mide preferentemente el cambio de LC3-I a LC3-II, ya que la forma II se relaciona directamente con el número de autofagosomas, aunque hay controversia sobre su interpretación (Mizushima y Yoshimori, 2007).

La Beclina-1 tiene un papel fundamental en la autofagia, regula su activación y adquisición de membranas para la formación de los autofagosomas (Zeng y cols., 2006), se ve reducida su expresión en las zonas afectadas en la EA de forma temprana implicando una reducción de la autofagia (Gunawardena y Goldstein, 2001) y su aumento reduce la patología A β .

La proteína p62 se considera un sustrato de la autofagia, por ello la vemos aumentada en los animales dobles mutantes, también se le atribuyen funciones de unión de ubiquitina (Geetha y Wooten, 2002) (Vadlamudi y cols., 1996) (Alves-Rodrigues y cols., 1998) y se la ha relacionado directamente con la patología EA en la formación temprana de los ovillos neurofibrilares (Kuusisto y cols., 2002), lo que apoyaría aún más la compensación de la falta de parkina en los ratones APP_{swe}/PK.

La autofagia requiere de la acción de los microtúbulos para el transporte de vesículas (Kovacs y Seglen, 1982; Kochl y *co/s.*, 2006). Un motivo por los que puede existir una disminución de la respuesta autofágica en los ratones APP_{swe} puede ser la degradación de los microtúbulos en este grupo, donde hemos visto mayor acumulación de tau (parte constitutiva del citoesqueleto) lo que conllevaría a una menor eficiencia en el flujo autofagico.

Nuestros datos sugieren que la anulación total o parcial de la expresión de la proteína parkina produce una sobreexpresión de sistemas de compensación frente a agresiones orientadas hacia una mayor supervivencia celular que reduce la patología observada en los ratones APP_{swe}, modelo de EA. La manipulación de estos sistemas de compensación podría ser un objetivo interesante como terapia en individuos con predisposición a padecer EA. Estos resultados demuestran que la manipulación de la ubiquitinización, la expresión de las chaperonas y la reacción autofagica puede contribuir a la defensa del estrés celular asociado a la acumulación de β -amiloide.

II. LA ANESTESIA CON ISOFLURANO AUMENTA LA PATOLOGÍA AMILOIDE EN UN MODELO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

En la segunda parte del estudio se investigó la influencia de la anestesia en la patología amiloide en el modelo murino APP_{swe} Tg2576 a una edad "presintomática" en patología amiloide para el ratón: 10,5 meses. El modelo experimental buscaba emular la situación de acumulo "crónico" de exposiciones a anestesia durante 3 meses y un modelo "agudo" (solo 3 dosis durante 5 días) en ratones con predisposición a patología de EA, para discernir si existía un empeoramiento de la patología fruto de las supuestas intervenciones en estos individuos.

En el modelo de exposición crónica se ha encontrado que los ratones APP_{swe} tratados con isoflurano tienen aumentada la mortalidad, una respuesta más tardía a la recuperación tras la anestesia, reducción en la exploración, mayor número de células apoptóticas en el hipocampo y cociente proapoptótico Bax/Bcl2. Además la astrogliá se vio reducida y aumentada la respuesta microglial, mayor acumulo de β -amiloide, una respuesta anormal de las chaperonas y reducida la autofagia con la exposición a isoflurano. Muchas de estas respuestas están incluidas en la patología de un paciente de EA, por lo que podemos asumir que el tratamiento agrava dicha patología y podría acelerar los mecanismos moleculares que la producen.

La anestesia y la enfermedad de Alzheimer, evidencia clínica

Existe un gran interés sobre el papel de la anestesia como un factor de riesgo en la patología EA. Varios estudios epidemiológicos ligaron un aumento del riesgo de padecer la enfermedad a edades tardías en pacientes expuestos a múltiples procesos de cirugía (Bohnen y cols., 1994a; Bohnen y cols., 1994b; Moller y cols., 1998; Knopman y cols., 2005; Lee y Gin, 2005; Monk y cols., 2008). Algunos de estos estudios tienen limitaciones estadísticas, ó la posibilidad de enmascaramiento debido a múltiples variables, por ejemplo la anestesia cardiovascular podría aumentar el riesgo de EA (Lee y cols., 2005; Henon y cols., 2006; Mielke y cols., 2007). Otros factores intraoperatorios,

como la hipotermia, en algunos tipos de intervenciones podría activar mecanismos relacionados con la EA, como la fosforilación de tau (Planel y cols., 2007). Además los anestésicos no son inocuos y modifican varias vías patogénicas que podrían producir en última instancia neurodegeneración, como la producida por calcio, alterar la señalización de IP3, aumentar la producción y agregación posterior de A β o la fosforilación de tau (Baranov y cols., 2009).

La evaluación cognitiva de los pacientes tras la anestesia esta basada en variables que hacen que la caracterización sea complicada, ya que se carece de un marcador de neurotoxicidad para los pacientes. La disfunción cognitiva tras una operación es un fenómeno común y mas acusado en pacientes de mayor edad que producen respuestas neurofisiológicas y psicomotoras mas lentas, demencia, delirio y problemas cognitivos (Moller y cols., 1998; Seymour y Severn, 2009; Fodale y cols., 2010). El sistema colinérgico esta en el centro de la regulación de la consciencia, la memoria y el aprendizaje y su malfuncionamiento podría jugar un papel fundamental en el POCD. Concentraciones clínicas de anestésicos inhalatorios actúan además sobre la oligomerización del amiloide y pueden producir apoptosis (Gauthier, 2002; Kar y Quirion, 2004; Bisette, 2009), sobre estos dos mecanismos actúa el isoflurano, en un ciclo que llevaría de apoptosis a acumulación de A β y esto aumentaría a su vez la muerte celular (Xie y cols., 2007) y efectos adversos sobre la síntesis de acetilcolina (Kar y Quirion, 2004; Kar y cols., 2004).

Estudios in vitro entre A β y la anestesia

Los estudios clínicos arrastran problemas metodológicos como es la imposibilidad de desligar los posibles efectos de la cirugía y la anestesia, y de ser situaciones complejas con multitud de variables (Ancelin y cols., 2010). Los estudios *in vitro* a pesar de ofrecer desventajas sí permiten en cambio un estudio con un control máximo de las variables del experimento. De estos estudios se pueden inferir posibles mecanismos pero no conclusiones generales. Los anestésicos inhalados actúan a nivel de varios mecanismos como la aparición de proteínas aberrantes, fallo sináptico y apoptosis celular. Su posible relación con la acumulación de proteínas se debe al aumento de producción y agregación de péptidos amiloide A β y la inducción posterior de la

hiperfosforilación y polimerización de la proteína tau (Run y cols., 2009). Se considera a los anestésicos como posibles candidatos que afectan la solubilidad del β -amiloide, y por esta vía de agregación aumentan su patogenicidad, ya que son moléculas de pequeño tamaño y altamente liposolubles.

La hipótesis de la disfunción sináptica de la EA establece que el A β compromete la función sináptica (Tanzi y Bertram, 2005) reduciendo los receptores NMDA aumentando su fagocitosis de la superficie de membrana. Los anestésicos también actúan a nivel de sinapsis en receptores relacionados con EA (NMDA, Ach, GABA-A y Ca⁺⁺), en mecanismos de comunicación celular. La exposición a isoflurano aumenta la neurotransmisión GABAérgica y es un agonista del glutamato en los receptores NMDA, produciendo mecanismo de neurotoxicidad a través de ambos receptores (Kudo y cols., 2001; Hansen y cols., 2004). Se considera un factor fundamental el tamaño de la molécula de anestésico en la oligomerización, pero se debe tener en cuenta también que este proceso es mucho más complejo que en las situaciones *in vitro*, que son condiciones extremadamente simplificadas (Finder y Glockshuber, 2007; Mandal y cols., 2010).

En los estudios *in vitro* es muy importante considerar las concentraciones utilizadas en los experimentos, tanto de β -amiloide como de anestésicos, que se aproximan a dosis clínicas. La mayor parte de los estudios se realizan utilizando fragmentos sintéticos de A β (1-40) y A β (1-42), pero en la naturaleza la longitud se muestra más heterogénea (Shoji y cols., 1992; Wang y cols., 1996). Además hay disparidad de resultados, dependiendo de la línea celular utilizada, la duración de la exposición y su porcentaje. Dependiendo del estudio se ha reportado que los anestésicos protegen contra la apoptosis (Kawaguchi y cols., 2005) o que la aumentan (Soriano y Anand, 2005; Perouansky, 2008). Aunque se ignoran los mecanismos exactos por los cuales se induce la neurotoxicidad, se postula que implica al calcio intracelular, que además juega un papel muy importante en la EA (Wei y Xie, 2009; Demuro y cols., 2010). Siguiendo esta línea se ha demostrado que los anestésicos inhalatorios aumentan la producción y agregación de β -amiloide, aumenta los

niveles de caspasa-3, induce apoptosis, eleva la producción de A β y aumenta los niveles de BACE (Xie y cols., 2006b; Xie y cols., 2007; Zhang y cols., 2008a; Zhang y cols., 2008b; Dong y cols., 2009). Por tanto se hipotetiza que una de las posibles vías para la activación de la apoptosis y la neurodegeneración podría ser el aumento de la generación y acumulación de A β , relacionándose por tanto la proteína "estrella" de la EA con uno de los efectos considerados probados en los fármacos anestésicos, especialmente los inhalatorios.

Pero estos datos proceden de modelos experimentales *in vitro*, en situaciones muy aisladas y es imposible realizar una extrapolación a lo que ocurre en un cerebro humano. Muchos de los datos sobre los efectos tóxicos de la anestesia se habían obtenido usando dosis quizá altas, lejos de las dosis fisiológicas o clínicas (Eckenhoff y cols., 2004; Xie y Tanzi, 2006; Wei y cols., 2008; Zhang y cols., 2008b). Se debe tener en cuenta que en algunos estudios con células transgénicas humanas H4-APP (que además son células indiferenciadas) las mismas dosis de anestesia han obtenido aumentos de la apoptosis en estas líneas, pero también en sus respectivos controles (Xie y cols., 2008; Zhang y cols., 2008a; Zhen y cols., 2009). Podría existir la posibilidad de que la apoptosis inducida por anestesia, también sea independiente de las alteraciones de la proteína β -amiloide.

La EA y los anestésicos in vivo

En nuestro estudio usamos un modelo de EA *in vivo* mostrando además una diferente reacción entre los ratones APP_{swe} (modelo de EA) y los controles WT. Los ratones APP_{swe} se mostraron más susceptibles a la toxicidad inducida por isoflurano que los WT. Bianchi (Bianchi y cols., 2008) y su grupo encontraron en hembras de 12 meses que la exposición a isoflurano producía cambios conductuales en los ratones controles WT pero no en los animales APP_{swe}, no obstante si hallaron diferencias entre las líneas WT y APP. Por el contrario, nuestros datos sugieren que la exposición a isoflurano sí produce cambios cognitivos diferenciales en función del genotipo, más sensibles en los APP_{swe} que en los controles WT sometidos a anestesia. Estas diferencias se pueden explicar por los distintos modelos experimentales. En su caso usaron

hembras de 12 meses de edad APP, donde el porcentaje de afectación por la patología EA es mayor sin necesidad o posibilidad de ver agravio por el tratamiento, lo que podría enmascarar el resultado. Nuestros ratones tenían una edad de inicio del tratamiento de 7 meses y de finalización del mismo a los 10 meses, además el tiempo de acumulación de anestesia es distinto y se aplicó de manera distinta: 10 horas (Bianchi) vs 8, y 5 días (Bianchi) vs 3 meses. Los números de animales y las técnicas utilizadas en la valoración cognitiva fueron distintas: laberinto en Y en nuestro caso y laberinto de Morris (Bianchi). En nuestro modelo experimental se evaluó también la posibilidad de problemas cardiovasculares. En principio la discrepancia de resultados se podría explicar considerando que Bianchi y cols encontraron diferencias en los WT expuestos a isoflurano de manera similar a nuestros resultados en machos WT y APP_{swe} "presintomáticos". En cualquier caso, ambos estudios señalarían que el isoflurano aceleraría la disfunción cognitiva en ratones ya adultos / mayores presintomáticos APP_{swe} y controles WT pero no en ratones ya con sintomatología tipo EA.

En la actividad exploratoria en el laberinto en Y, los ratones APP_{swe} realizan un menor número de exploraciones en 5 minutos que los WT, pero además los ratones APP_{swe} sometidos a la anestesia reducen aún más este número *versus* los ratones APP_{swe} controles. Como suma a este posible déficit cognitivo se ha visto como los ratones APP_{swe} tienen un despertar, un tiempo de "edución" de la anestesia mayor que los animales WT. Estos datos podrían estar relacionados con la disfunción cognitiva post operatoria que se observa en pacientes tras intervenciones con anestesia, y que solapa muchas características con la EA. Nuestros resultados no parecen justificar la apoptosis inducida por los procesos anestésicos con la fosforilación de la proteína tau y aumento de amiloidogénesis por hipotermia, que puede generar ambas reacciones, sino por un procesamiento incorrecto de proteínas debido a la anestesia. Encontramos además una expresión de proteínas de respuesta a estrés, como HSP70, aumentada por el tratamiento en APP_{swe} pero no en WT. Tenemos por tanto una respuesta de mayor estrés en los animales transgénicos que en los controles WT, mostrando mayor sensibilidad debido al genotipo.

El papel de la autofagia en enfermedades neurodegenerativas es clave por su implicación en la "limpieza" de proteínas (Cuervo y cols., 2005; Cuervo, 2006; Rodríguez-Navarro y cols., 2010). En nuestro modelo observamos una respuesta diferencial en los marcadores de autofagia tras la anestesia, una disminución en APP_{swe} con anestesia mientras que vemos un aumento en la reacción de los WT con isoflurano unido también a un aumento de agregados y fragmentos de A β . Otros resultados importantes son los efectos sinérgicos de genotipo y la anestesia en valores de astrogliá, donde la reacción en los WT frente al tratamiento no se produce en APP_{swe}, y microglía donde por contra encontramos sólo un aumento en los transgénicos APP_{swe} con anestesia. En el caso de GFAP es posible que ante la "agresión" que supone el isoflurano los WT tengan capacidad de reacción mientras que la reacción de APP_{swe} se haya visto saturada por quizá, un estado degenerativo sumado a la influencia del tratamiento acumulado en el tiempo de exposición. Esta hipótesis se podría confirmar con la expresión de la microglía, aumentada, quizá por una mayor neuroinflamación en el modelo APP_{swe} tratado con isoflurano.

Considerando los resultados que relacionan la EA y la anestesia en estudios epidemiológicos, siendo reforzados con los estudios *in vitro*, era importante realizar estudios *in vivo* que se aproximen más a la complejidad del problema. Estos resultados no deben de dar la idea de que la anestesia es un factor de riesgo crítico en la EA. Los datos se han obtenido en un modelo experimental que no esta exento de problemas a la hora de trasladar los datos a la clínica, pero es necesario para obtener resultados en un periodo razonable de tiempo. El modelo experimental representa una aplicación del isoflurano un poco mayor que la dosis normalmente aplicada en intervenciones humanas. En nuestro caso aplicamos un 2% de isoflurano en un flujo de oxígeno puro, normalmente usado en veterinaria e investigación, en clínica el % de isoflurano no suele rebasar el 1% (ED50 isoflurano = 1.1%) pero siendo siempre acompañado por relajantes musculares y óxido nítrico como vehículo, lo cuál reduce su CAM (Miller D, 1994; Barash G, 2001; Torres M, 2001; Hurford E, 2002). Se han relacionado resultados parecidos con problemas cardiovasculares, no obstante no hemos encontrado problemas importantes al

monitorizar todos los procesos de anestesia, aparte de una diferencia menor en la tasa respiratoria y cardiaca basal entre los ratones WT y APP.

En los pacientes de EA se observan clínicas parecidas a las observadas en los pacientes que sufren POCD, aunque en el caso de los últimos suelen ser de tiempo variable, de horas a meses, pero transitorias: pérdida de memoria, deterioro cognitivo, desorientación, confusión, depresión, ansiedad e insomnio. En los pacientes de EA se suele considerar que la pérdida progresiva de neuronas y las deficiencias en los niveles de acetilcolina correlacionan con la gravedad de la enfermedad (Schifilliti y *cols.*, 2010). Podríamos encontrar que la actividad sobre la proteína amiloide de la anestesia, y el mecanismo de pérdida neuronal al que se atribuye al amiloide el papel de disparador, se encuentren relacionadas (Fodale y *cols.*, 2006; Rubio y *cols.*, 2006).

Otra posible explicación de esta relación se podría encontrar en la teoría de la "reserva cognitiva". Se ha visto que pacientes con historial de accidentes cerebro-vasculares asintomáticos en el momento de la operación quedan más afectados y son más proclives a padecer POCD (Marcantonio y *cols.*, 1994; Monk y *cols.*, 2008). Por lo que si una disfunción cerebral previa es un claro factor de riesgo de padecer POCD, podría entenderse que tanto la edad como una predisposición genética, que aumentan la posibilidad de sufrir una demencia, lo sean también. No obstante se necesita un mayor número de estudios básicos y clínicos con un mayor control de las variables para poder conocer mejor los mecanismos que subyacen para probar esta hipótesis.

Estos resultados, junto con los ya publicados anteriormente sí deben de orientar sobre la importancia de la elección de anestésicos en determinados pacientes y situaciones, por ejemplo en pacientes de elevada edad o predisposición genética a enfermedades como la EA.

III. LA TREHALOSA COMO PROTECCIÓN DE LA PATOLOGÍA AMILOIDE INDUCIDA POR ISOFLURANO EN UN MODELO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

En la EA se han intentado numerosas terapias buscando como objetivo reducir la producción / acumulación de la proteína β -amiloide, limpiar los agregados de la sangre o inhibir el cambio conformacional de $A\beta$ a su forma de barril- β , bloqueando de esta manera la oligomerización (LeVine, 2002). Un gran número de pequeñas moléculas se han mostrado capaces de inhibir la agregación, y entre ellas la trehalosa se había mostrado previamente efectiva en la inhibición de la agregación de poliglutaminas (Tanaka y cols., 2004), en la disminución de la patología en un modelo de taupatía y parkinsonismo (Rodríguez-Navarro y cols., 2010) y también en la agregación del amiloide (Liu y cols., 2005b).

En este estudio hemos encontrado que la trehalosa protege del agravamiento de la patología amiloide mediante el tratamiento con el anestésico isoflurano en un modelo de EA. En los ratones APP_{swe} expuestos a tratamientos agudos con isoflurano hemos visto como se produce un aumento de las células apoptóticas, mayor respuesta de la astrogliosis, un mayor número de agregados de β -amiloide y respuesta deficiente de las chaperonas moleculares y la autofagia. Hemos visto como el tratamiento con trehalosa 1% en el agua de bebida una semana antes del inicio de la exposición a la anestesia protege del recrudecimiento de los síntomas producidos en los ratones APP_{swe}.

Los factores modificadores de la toxicidad por anestesia, tanto genéticos como ambientales, tienen una enorme importancia y trascendencia en múltiples disciplinas. Además el vínculo que comienza a probarse con varios estudios en la actualidad entre la anestesia y el padecimiento de Alzheimer hace que la búsqueda de un neuroprotector para reducir este riesgo en una población cada vez más envejecida sea fundamental. La anestesia y la cirugía son considerados factores de riesgo, basándose sobre todo en estudios *in vitro* y epidemiológicos. La relevancia clínica de algunos estudios *in vitro*, indicando

efectos tóxicos de las neuronas sometidas a anestesia, han sido cuestionados por las altas concentraciones de anestésico utilizado, lejos de las concentraciones fisiológicas y clínicas de isoflurano (Eckenhoff y cols., 2004; Johansson y cols., 2004; Tanzi y Bertram, 2005; Xie y cols., 2006b; Liang y cols., 2008; Wei y cols., 2008; Zhang y cols., 2008a; Dong y cols., 2009). En nuestro estudio previo se realizó en un experimento *in vivo* y muestra, a concentraciones utilizadas en animales de experimentación (4% inducción y 2% mantenimiento de isoflurano), un efecto diferencial entre los ratones APP_{swe} y los controles WT en toxicidad por isoflurano. Nuestra intención con este estudio era estudiar si existe toxicidad en un modelo de EA sometido a procesos de anestesia aguda, durante cortos periodos de tiempo, frente a procesos anestésicos crónicos, durante una etapa larga del individuo: 3 exposiciones cortas (20 a 30 minutos) a la semana durante 3 meses.

La traslación de estos resultados a la práctica clínica podría significar que el proceso anestésico sería seguro para la mayoría de los pacientes que se someten a ella, pero aumentarían los riesgos de padecer EA en edades avanzadas en pacientes con predisposición a padecerla. Trabajos *in vivo* encontraron que la exposición a isoflurano y halotano no aumentaba el deterioro cognitivo en animales APP_{swe} y sí lo hacía en ratones WT. Nuestro estudio se realizó en ratones de 11 meses, los cuales no tienen aún deterioro cognitivo, en principio en un estado presintomático, y sí que observamos adelantamiento de la patología en estos ratones.

Un modelo de anestesia aguda

Una vez demostrada la toxicidad en un modelo de EA crónico nuestra intención fue mostrar los efectos de una exposición aguda a la anestesia. Para ello se varió el modelo experimental aplicando a los animales sólo 3 exposiciones largas a una menor concentración (1 hora y media al 1%) y durante una semana, con 48 horas entre ellas. Con ello obtuvimos una mayor sensibilización de los animales transgenicos y un modelo más semejante a la práctica clínica en pacientes. Aprovechando este nuevo modelo más práctico y fisiológico se aplicó un posible neuroprotector como es la trehalosa. Durante el procedimiento experimental con isoflurano al 1% y O₂ al 99% con control de la

temperatura no se observaron cambios en la presión arterial y saturación parcial de oxígeno, por lo que no se explican los resultados por depresión cardio-respiratoria en los ratones.

Considerando las reacciones obtenidas con la exposición crónica cabía plantearse qué sucedió con una exposición no tan extensa de exposiciones acumuladas. Este modelo buscaba responder a varias cuestiones:

- 1) ¿Qué sucede en un sistema antes de la saturación de respuesta por acumulaciones dilatadas en el tiempo?,
- 2) Qué efectos más inmediatos en la anestesia y si hay diferencias debidas a la susceptibilidad genética y
- 3) La búsqueda de un modelo más útil y rápido para contrarestar los efectos de los anestésicos.

Los resultados de este tratamiento mostraron diferencias entre los grupos de análisis: WT y APP_{swe} en muerte celular, reacción astrogial, chaperonas, acúmulo de proteína amiloide por WB, no en placas de amiloide pero sí en acúmulos de tau.

El modelo se ha mostrado por tanto útil ya que observamos variaciones en las respuestas por estas exposiciones agudas. En conducta las diferencias no son significativas por la aplicación de la anestesia. Pero en muerte celular este modelo se muestra efectivo en aumentar la apoptosis, además encontramos exacerbada la muerte en el grupo APP_{swe}, manteniendo la diferencia debida al genotipo, encontrado en el tratamiento crónico. La chaperona HSP70 aumenta en ambos modelos, crónico y agudo, y en ambos genotipos debido a la exposición a isoflurano. En la astroglia el modelo WT aumenta su reacción ante la anestesia, en cambio tenemos diferente reacción en el grupo APP_{swe} agudo frente al crónico, en el agudo esta reacción aumenta mucho más en APP_{swe} que en WT, al contrario que en el crónico donde veíamos una disminución de la respuesta. Esta respuesta diferencial puede deberse al momento de análisis de la respuesta, en el crónico la respuesta frente a la agresión estaría sobrepasada, no obstante en el modelo agudo dicho punto de saturación aun no se habría alcanzado. Es por tanto razonable considerar que debido a su mayor susceptibilidad al isoflurano el modelo APP_{swe} tenga una mayor reacción astrogial, para compensar sus tóxicos

efectos. Las diferencias en la expresión de CHIP entre modelos se podrían explicar de manera parecida. Una agresión continuada en el tiempo (modelo crónico) hace que WT aumente sus niveles y APP_{swe} los disminuya, posiblemente debido a la saturación mencionada. Pero en el experimento agudo, en los niveles de CHIP, son los ratones APP_{swe} los que tienen una mayor reacción que WT, en principio por su mayor susceptibilidad al isoflurano que es mayor.

Trehalosa y neuroprotección en un modelo de EA y anestesia agudo

La trehalosa es rápidamente asimilada en el agua de bebida de los ratones y al tener una concentración baja, 1%, junto con la mitad de capacidad de endulzar de la glucosa, no se observan diferencias en la ingesta de comida y bebida con los ratones controles. Además la trehalosa no cruza las membranas celulares pero si se transporta con facilidad mediante pinocitosis, por lo que también tendría efectos en el citoplasma celular, pasa la barrera hematoencefálica y disminuye el estrés oxidativo (Wolkers y cols., 2001).

En los ratones APP_{swe} tratados con trehalosa 1%, previamente y durante la exposición a isoflurano, se mejoran los comportamientos cognitivos, el número de células apoptóticas en hipocampo y córtex y el cociente de proteínas pro / anti-apoptóticas disminuyen, los acúmulos de tau, niveles de tau fosforilada y la astrogliosis también disminuyen como consecuencia del tratamiento con trehalosa. Además la trehalosa reduce los agregados inducidos por isoflurano en los ratones APP_{swe}. Los efectos de la trehalosa se deben, al menos en parte, a la activación de la autofagia y su acción en las chaperonas, además de los efectos físico-químicos de protección de proteínas de la trehalosa: sustitución de agua, formación de cristales y estabilización de proteínas (Beranger y cols., 2008; Suarez y cols., 2008; Iturriaga y cols., 2009; Jain y Roy, 2009). La actividad como chaperona química podría haber ayudado a la estabilización de las proteínas como tau y facilitando la eliminación de β -amiloide por las vías no amiloidogénicas. La trehalosa se une al A β , cambia la dinámica de los oligómeros solubles, promueve la inserción del β -amiloide en las membranas y atenúa la permeabilidad de la membrana a los oligómeros (Arora y cols., 2004; Qi y cols., 2009; Reddy y cols., 2009; Izmitli y cols., 2010).

Considerando que la reacción de la astrogliosis en WT y APP surge ante el estímulo producido por la anestesia con isoflurano, la trehalosa reduce esta respuesta muy significativamente en ambos grupos (WT y APP) volviendo a los niveles de animales controles sin exposición al anestésico. Es también interesante la reacción diferencial a nivel de chaperona HSP70 y CHIP que produce la trehalosa en los ratones WT y APP_{swe}, donde en APP_{swe} si observamos como produce un aumento de estas proteínas que además se consideran que actúan en conjunto para la eliminación del A β , pero esta reacción no se observa en WT. Esto podría deberse a una menor patología en WT que en APP como se demuestra por los índices de muerte Bax/Bcl2, pero también porque en los animales WT las posibles acumulaciones de proteínas debido al isoflurano podrían ser eliminadas de manera más eficiente por el proteosoma. Las proteínas que son accesibles por ambos sistemas de degradación, UPS y autofagia, son preferentemente eliminadas vía UPS por su mayor eficiencia. De manera que es posible que el apoyo de chaperonas y ubiquitin ligasas (como CHIP) solo sea necesario ante una saturación de agregados como se esperaría en el modelo APP, pero no en WT, con anestesia.

Wang (Wang y cols., 2009) propuso que la translocación ineficiente de fragmentos de tau a través de la membrana lisosomal promueve la formación de oligómeros de tau en la superficie y actuando como precursores de la agregación, resultando en la rotura de la membrana lisosomal. La disminución de los niveles de tau, que nosotros observamos *in vivo*, podría pues ser mediada por la trehalosa, que disminuiría la permeabilidad de la membrana a los oligómeros y previniendo de roturas en lisosomas que verterían hidrolasas en el citosol. Hemos demostrado previamente que la trehalosa disminuye la patología tau y el daño a neuronas dopaminérgicas que se observa en ratones knock-out para parkin y knock-in para la proteína tau (PK^{-/-} / Tau^{vlw}) mediante la activación de la autofagia (Rodriguez-Navarro y cols., 2010). La trehalosa en estos ratones incrementa la expresión de LC-3II en el estriado y en las vacuolas autofágicas aisladas de hígado, además de disminuir la acumulación de p62, representando un posible aumento de los niveles de autofagia debido

al tratamiento con trehalosa. También se observó una disminución de los niveles de tau y p-tau en diferentes zonas cerebrales. Por tanto se puede pensar que la trehalosa no solo afecta la inducción de autofagia, sino también mejora el procesamiento de la fusión autofagosoma-lisosoma (Rodríguez-Navarro y cols., 2010). Además hay que considerar que la proteína Beclina, como marcadora de autofagia, disminuye su expresión en las etapas tempranas de la EA (Pickford y cols., 2008).

Una de las explicaciones potenciales de los efectos de la trehalosa podría obtenerse por sus propiedades termodinámicas. El fragmento mas amiloidogénico es el A β 42: este tiene capacidades hidrofóbicas mucho mayores que el A β 40 y por tanto en un medio acuoso tiende a formar agregados con mucha mayor velocidad, la formación por tanto de los péptidos tóxicos de la vía amiloidogénica es más favorable que la vía no amiloidogénica. Para que este proceso de agregación sea espontáneo debe de obtener un resultado negativo en la ecuación de la energía libre:

$$\Delta G \text{ (energía libre)} = \Delta H \text{ (entalpía)} - T \text{ (temperatura)} \Delta S \text{ (entropía)}$$

Un resultado negativo implica que esta reacción libera energía y por tanto sería espontánea. Pero la administración de trehalosa y su capacidad de unión con las moléculas de agua hace que esta reacción sea menos favorable, la trehalosa "rodea" las moléculas de agua haciendo que las moléculas de A β disminuyan su energía libre de unión e impide y/o retrasa su agregación (Liu y cols., 2005b).

Numerosos estudios sugieren que las poblaciones de edad avanzada que se someten a procesos de anestesia general experimentan estados de deficiencia cognitiva similares a las demencias. La EA es la principal demencia en número de personas afectas y el envejecimiento es el principal factor en su padecimiento. A su vez la población mundial de los países en desarrollo envejece, esto hace que los pacientes en las cirugías sean cada vez de mayor edad, aumentando los riesgos por efecto de la anestesia. Evidencias clínicas y

epidemiológicas apuntan a las intervenciones quirúrgicas como un factor de riesgo en los cambios de proteínas implicadas en la EA (Ritchie y cols., 2010), por lo que cualquier posible asociación debe estudiarse con detenimiento y deben de buscarse métodos de neuroprotección que sean factibles para contrarrestar estos efectos.

Considerando los resultados obtenidos en los experimentos *in vivo* con isoflurano podemos concluir que el tratamiento con este anestésico parece no tener efectos negativos muy patentes en ratones controles, pero sí muestra aumento de toxicidad en un modelo de EA en un estado pre-patológico. La anestesia por tanto sería segura en la mayor parte de los pacientes, pero podría complicar y/o adelantar patologías tipo Alzheimer en pacientes con predisposición genética a padecerla. Una selección adecuada, posterior a un estudio de los perfiles de riesgo previo en los pacientes, permitiría utilizar un tipo de anestesia más adecuado, sustituir la anestesia general por local, que podría ayudar a disminuir dicho riesgo (Mena y cols., 2010; Perucho y cols., 2010a, b). En los estudios experimentales mostrados, la trehalosa ha supuesto un compuesto efectivo en la prevención de la patología producida por la anestesia. La trehalosa se ha mostrado muy efectiva reduciendo no solo la patología A β y tau, sino aumentando respuestas positivas para el paliamiento de la sintomatología de EA.

La producción industrial de la trehalosa es muy asequible, tiene una tolerancia muy alta, carece de efectos secundarios conocidos y puede atravesar la barrera hematoencefálica y por tanto actuar a nivel cerebral. Considerando las ventajas y los inconvenientes se deberían realizar estudios clínicos incorporándola como parte de una estrategia de quizá no solo tratamiento sino prevención, en pacientes con alelos de ApoE (apoE4), mutaciones en APP y presenilinas 1 y 2 en posibles escenarios de riesgo como anestesias.

VII- CONCLUSIONES

- 1) La ausencia parcial y total de la proteína parkina en los ratones dobles mutantes, $APP_{swe}/PK^{+/-}$ y $APP_{swe}/PK^{-/-}$, produce una mejora de la patología amiloide en comparación con los APP_{swe} . Mejoras en conducta, menores índices de muerte celular, menor expresión de microglía y menor acúmulo de proteínas amiloide y tau de los dobles mutantes APP_{swe}/PK respecto de los transgénicos simples APP_{swe} .
- 2) La ausencia de parkina produce un aumento de mecanismos de compensación como chaperonas, autofagia y glutathione en los dobles mutantes. Dicha mejora en el fenotipo APP_{swe} se mantiene en los dobles mutantes a los 12 meses y a los 16 meses de edad, abarcando tanto edades iniciales de la patología como avanzadas.
- 3) Los ratones APP_{swe} muestran una mayor susceptibilidad al isoflurano tanto en el modelo crónico como en el agudo. Esta mayor susceptibilidad podría estar relacionada con el fenotipo amiloide. La anestesia con isoflurano agrava la patología amiloide en el modelo murino de Alzheimer APP_{swe} , aumentando la apoptosis, empeorando la conducta y supervivencia, la respuesta de la microglía y proteínas de estrés y disminuyendo las respuestas de compensación del organismo.
- 4) La anestesia sería segura en la mayoría de los individuos, no obstante debería tenerse en cuenta la predisposición genética de los pacientes a enfermedades como el Alzheimer antes de someterlos a cirugías, ya que se podría afectar a largo plazo el fenotipo de la enfermedad.
- 5) La trehalosa, un disacárido con capacidades de chaperona molecular, aumento de autofagia y de protección de estructuras proteicas, se ha mostrado muy eficaz en frenar el aumento de la patología amiloide en ratones APP_{swe} sometidos a anestesia. Sumado a su ausencia de efectos secundarios, la sencilla síntesis industrial y su bajo coste de producción, hace que sea un candidato a ser utilizado como neuroprotector en proteinopatías como el Alzheimer.

VIII- BIBLIOGRAFÍA

VIII. Bibliografía

- Abildstrom H, Rasmussen LS, Rentowl P, Hanning CD, Rasmussen H, Kristensen PA & Moller JT. (2000). Cognitive dysfunction 1-2 years after non-cardiac surgery in the elderly. ISPOCD group. International Study of Post-Operative Cognitive Dysfunction. *Acta Anaesthesiol Scand* **44**, 1246-1251.
- Aguib Y, Heiseke A, Gilch S, Riemer C, Baier M, Schatzl HM & Ertmer A. (2009). Autophagy induction by trehalose counteracts cellular prion infection. *Autophagy* **5**, 361-369.
- Almeida CG, Takahashi RH & Gouras GK. (2006). Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. *J Neurosci* **26**, 4277-4288.
- Alves-Rodrigues A, Gregori L & Figueiredo-Pereira ME. (1998). Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration. *Trends Neurosci* **21**, 516-520.
- Alzheimer A, Forstl H & Levy R. (1991). On certain peculiar diseases of old age. *Hist Psychiatry* **2**, 71-101.
- Ancelin ML, de Roquefeuil G, Scali J, Bonnel F, Adam JF, Cheminal JC, Cristol JP, Dupuy AM, Carriere I & Ritchie K. (2010). Long-term post-operative cognitive decline in the elderly: the effects of anesthesia type, apolipoprotein E genotype, and clinical antecedents. *J Alzheimers Dis* **22 Suppl 3**, 105-113.
- Anderson JP, Chen Y, Kim KS & Robakis NK. (1992). An alternative secretase cleavage produces soluble Alzheimer amyloid precursor protein containing a potentially amyloidogenic sequence. *J Neurochem* **59**, 2328-2331.
- Ansar S, Burlison JA, Hadden MK, Yu XM, Desino KE, Bean J, Neckers L, Audus KL, Michaelis ML & Blagg BS. (2007). A non-toxic Hsp90 inhibitor protects neurons from Abeta-induced toxicity. *Bioorg Med Chem Lett* **17**, 1984-1990.
- Arab L & Sabbagh MN. (2010). Are certain lifestyle habits associated with lower Alzheimer's disease risk? *J Alzheimers Dis* **20**, 785-794.
- Arai C, Kohguchi M, Akamatsu S, Arai N, Yoshizane C, Hasegawa N, Hanaya T, Arai S, Ikeda M & Kurimoto M. (2001). Trehalose suppresses lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis bone marrow in mice. *Nutr Res* **21**, 993-999.
- Ardley HC & Robinson PA. (2004). The role of ubiquitin-protein ligases in neurodegenerative disease. *Neurodegener Dis* **1**, 71-87.
- Arguelles JC. (2000). Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch Microbiol* **174**, 217-224.
- Arora A, Ha C & Park CB. (2004). Inhibition of insulin amyloid formation by small stress molecules. *FEBS Lett* **564**, 121-125.
- Avila J. (2010). Intracellular and extracellular tau. *Front Neurosci* **4**, 49.
- Avila J, Lucas JJ, Perez M & Hernandez F. (2004a). Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* **84**, 361-384.
- Avila J, Perez M, Lim F, Gomez-Ramos A, Hernandez F & Lucas JJ. (2004b). Tau in neurodegenerative diseases: tau phosphorylation and assembly. *Neurotox Res* **6**, 477-482.
- Babu JR, Geetha T & Wooten MW. (2005). Sequestosome 1/p62 shuttles polyubiquitinated tau for proteasomal degradation. *J Neurochem* **94**, 192-203.
- Bae YJ, Park KS & Kang SJ. (2003). Genomic organization and expression of parkin in *Drosophila melanogaster*. *Exp Mol Med* **35**, 393-402.
- Baranov D, Bickler PE, Crosby GJ, Culley DJ, Eckenhoff MF, Eckenhoff RG, Hogan KJ, Jevtovic-Todorovic V, Palotas A, Perouansky M, Planel E, Silverstein JH, Wei H, Whittington RA, Xie Z & Zuo Z. (2009). Consensus statement: First International Workshop on Anesthetics and Alzheimer's disease. *Anesth Analg* **108**, 1627-1630.

- Barash G CF, Stoelting K, Cahalan M. (2001). Clinical anesthesia, 4th edition edn. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Barbeau A, Dallaire L, Buu NT, Poirier J & Rucinska E. (1985). Comparative behavioral, biochemical and pigmentary effects of MPTP, MPP+ and paraquat in *Rana pipiens*. *Life Sci* **37**, 1529-1538.
- Bekris LM, Mata IF & Zabetian CP. (2010). The genetics of Parkinson disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* **23**, 228-242.
- Benaroudj N, Lee DH & Goldberg AL. (2001). Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J Biol Chem* **276**, 24261-24267.
- Bence NF, Sampat RM & Kopito RR. (2001). Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* **292**, 1552-1555.
- Benke T. (1993). Two forms of apraxia in Alzheimer's disease. *Cortex* **29**, 715-725.
- Beranger F, Crozet C, Goldsborough A & Lehmann S. (2008). Trehalose impairs aggregation of PrPSc molecules and protects prion-infected cells against oxidative damage. *Biochem Biophys Res Commun* **374**, 44-48.
- Bergamini E, Cavallini G, Donati A & Gori Z. (2007). The role of autophagy in aging: its essential part in the anti-aging mechanism of caloric restriction. *Ann N Y Acad Sci* **1114**, 69-78.
- Berridge MJ. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**, 315-325.
- Bettens K, Sleegers K & Van Broeckhoven C. (2010). Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future. *Hum Mol Genet* **19**, R4-R11.
- Bianchi SL, Caltagarone BM, Laferla FM, Eckenhoff RG & Kelz MB. (2010). Inhaled anesthetic potency in aged Alzheimer mice. *Anesth Analg* **110**, 427-430.
- Bianchi SL, Tran T, Liu C, Lin S, Li Y, Keller JM, Eckenhoff RG & Eckenhoff MF. (2008). Brain and behavior changes in 12-month-old Tg2576 and nontransgenic mice exposed to anesthetics. *Neurobiol Aging* **29**, 1002-1010.
- Biskup S, Moore DJ, Celsi F, Higashi S, West AB, Andrabi SA, Kurkinen K, Yu SW, Savitt JM, Waldvogel HJ, Faull RL, Emson PC, Torp R, Ottersen OP, Dawson TM & Dawson VL. (2006). Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain. *Ann Neurol* **60**, 557-569.
- Bisette G. (2009). Mini-forum: Roles of amyloid-beta and tau phosphorylation in neuronal repair and protection. *J Alzheimers Dis* **18**, 369-370.
- Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H & Johansen T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* **171**, 603-614.
- Bohnen N, Warner MA, Kokmen E & Kurland LT. (1994a). Early and midlife exposure to anesthesia and age of onset of Alzheimer's disease. *Int J Neurosci* **77**, 181-185.
- Bohnen NI, Warner MA, Kokmen E, Beard CM & Kurland LT. (1994b). Alzheimer's disease and cumulative exposure to anesthesia: a case-control study. *J Am Geriatr Soc* **42**, 198-201.
- Boland B, Kumar A, Lee S, Platt FM, Wegiel J, Yu WH & Nixon RA. (2008). Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **28**, 6926-6937.
- Bonifati V, Rizzu P, Squitieri F, Krieger E, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, van Duijn CM, Oostra B, Meo G & Heutink P. (2003). DJ-1(PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol Sci* **24**, 159-160.
- Bonin-Guillaume S, Zekry D, Giacobini E, Gold G & Michel JP. (2005). [The economical impact of dementia]. *Presse Med* **34**, 35-41.
- Bretsky PM, Buckwalter JG, Seeman TE, Miller CA, Poirier J, Schellenberg GD, Finch CE & Henderson VW. (1999). Evidence for an interaction between

- apolipoprotein E genotype, gender, and Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **13**, 216-221.
- Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K & Arrighi HM. (2007). Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **3**, 186-191.
- Bulteau AL, Petropoulos I & Friguet B. (2000). Age-related alterations of proteasome structure and function in aging epidermis. *Exp Gerontol* **35**, 767-777.
- Burns KE, Liu WT, Boshoff HI, Dorresteijn PC & Barry CE, 3rd. (2009). Proteasomal protein degradation in Mycobacteria is dependent upon a prokaryotic ubiquitin-like protein. *J Biol Chem* **284**, 3069-3075.
- Caceres A & Kosik KS. (1990). Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* **343**, 461-463.
- Carlesimo GA & Oscar-Berman M. (1992). Memory deficits in Alzheimer's patients: a comprehensive review. *Neuropsychol Rev* **3**, 119-169.
- Casarejos MJ, Menendez J, Solano RM, Rodriguez-Navarro JA, Garcia de Yebenes J & Mena MA. (2006). Susceptibility to rotenone is increased in neurons from parkin null mice and is reduced by minocycline. *J Neurochem* **97**, 934-946.
- Casarejos MJ, Solano RM, Menendez J, Rodriguez-Navarro JA, Correa C, Garcia de Yebenes J & Mena MA. (2005). Differential effects of L-DOPA on monoamine metabolism, cell survival and glutathione production in midbrain neuronal-enriched cultures from parkin knockout and wild-type mice. *J Neurochem*.
- Caza N, Taha R, Qi Y & Blaise G. (2008). The effects of surgery and anesthesia on memory and cognition. *Prog Brain Res* **169**, 409-422.
- Ciechanover A & Brundin P. (2003). The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* **40**, 427-446.
- Cookson MR. (2005). The biochemistry of Parkinson's disease. *Annu Rev Biochem* **74**, 29-52.
- Coraci IS, Husemann J, Berman JW, Hulette C, Dufour JH, Campanella GK, Luster AD, Silverstein SC & El-Khoury JB. (2002). CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils. *Am J Pathol* **160**, 101-112.
- Crosby C, Culley DJ, Baxter MG, Yukhananov R & Crosby G. (2005). Spatial memory performance 2 weeks after general anesthesia in adult rats. *Anesth Analg* **101**, 1389-1392.
- Crowe JH, Crowe LM & Chapman D. (1984). Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* **223**, 701-703.
- Crowe JH, Crowe LM, Oliver AE, Tsvetkova N, Wolkers W & Tablin F. (2001). The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology* **43**, 89-105.
- Crowe JH, Leslie SB & Crowe LM. (1994). Is vitrification sufficient to preserve liposomes during freeze-drying? *Cryobiology* **31**, 355-366.
- Cuervo AM. (2006). Autophagy in neurons: it is not all about food. *Trends Mol Med* **12**, 461-464.
- Cuervo AM, Bergamini E, Brunk UT, Droge W, Ffrench M & Terman A. (2005). Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. *Autophagy* **1**, 131-140.
- Culetto E & Sattelle DB. (2000). A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. *Hum Mol Genet* **9**, 869-877.
- Culley DJ, Baxter M, Yukhananov R & Crosby G. (2003). The memory effects of general anesthesia persist for weeks in young and aged rats. *Anesth Analg* **96**, 1004-1009, table of contents.
- Culley DJ, Baxter MG, Crosby CA, Yukhananov R & Crosby G. (2004). Impaired acquisition of spatial memory 2 weeks after isoflurane and isoflurane-nitrous oxide anesthesia in aged rats. *Anesth Analg* **99**, 1393-1397; table of contents.

- Culley DJ & Crosby G. (2008). Nitrous oxide in neuroanesthesia: tried and true or toxin? *Anesthesiology* **108**, 553-554.
- Culley DJ, Xie Z & Crosby G. (2007). General anesthetic-induced neurotoxicity: an emerging problem for the young and old? *Curr Opin Anaesthesiol* **20**, 408-413.
- Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, Irizarry M, Younkin L, Good MA, Bliss TV, Hyman BT, Younkin SG & Hsiao KK. (1999). Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci* **2**, 271-276.
- Chen Q & Haddad GG. (2004). Role of trehalose phosphate synthase and trehalose during hypoxia: from flies to mammals. *J Exp Biol* **207**, 3125-3129.
- Cheng VY, Martin LJ, Elliott EM, Kim JH, Mount HT, Taverna FA, Roder JC, Macdonald JF, Bhambri A, Collinson N, Wafford KA & Orser BA. (2006). Alpha5GABAA receptors mediate the amnestic but not sedative-hypnotic effects of the general anesthetic etomidate. *J Neurosci* **26**, 3713-3720.
- Cherra SJ, 3rd, Dagda RK & Chu CT. (2010). Review: autophagy and neurodegeneration: survival at a cost? *Neuropathol Appl Neurobiol* **36**, 125-132.
- Cho S, and Robinson1,2 (1997). Understanding all of water's anomalies with a nonlocal potential. *Journal of Chemical Physics* **107**.
- Dahm R. (2006). Alzheimer's discovery. *Curr Biol* **16**, R906-910.
- Dale RC, Church AJ, Surtees RA, Lees AJ, Adcock JE, Harding B, Neville BG & Giovannoni G. (2004). Encephalitis lethargica syndrome: 20 new cases and evidence of basal ganglia autoimmunity. *Brain* **127**, 21-33.
- Demuro A, Parker I & Stutzmann GE. (2010). Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease. *J Biol Chem* **285**, 12463-12468.
- Dickson CT, Mena AR & Alonso A. (1997). Electroresponsiveness of medial entorhinal cortex layer III neurons in vitro. *Neuroscience* **81**, 937-950.
- Dickson DW. (1999). Microglia in Alzheimer's disease and transgenic models. How close the fit? *Am J Pathol* **154**, 1627-1631.
- Dong Y, Zhang G, Zhang B, Moir RD, Xia W, Marcantonio ER, Culley DJ, Crosby G, Tanzi RE & Xie Z. (2009). The common inhalational anesthetic sevoflurane induces apoptosis and increases beta-amyloid protein levels. *Arch Neurol* **66**, 620-631.
- Donovan MH, Yazdani U, Norris RD, Games D, German DC & Eisch AJ. (2006). Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* **495**, 70-83.
- Eckel B, Blobner M & Rammes G. (2010). Anesthetics promoting in vitro AbetaPP metabolism and amyloid-beta toxicity. *J Alzheimers Dis* **22 Suppl 3**, 21-26.
- Eckenhoff MF & Eckenhoff RG. (2010). A smoking gun but still no victim. *J Alzheimers Dis* **19**, 1259-1260; discussion 1261.
- Eckenhoff R, Zheng W & Kelz M. (2008). From anesthetic mechanisms research to drug discovery. *Clin Pharmacol Ther* **84**, 144-148.
- Eckenhoff RG. (2001). Promiscuous ligands and attractive cavities: how do the inhaled anesthetics work? *Mol Interv* **1**, 258-268.
- Eckenhoff RG. (2008). Why can all of biology be anesthetized? *Anesth Analg* **107**, 859-861.
- Eckenhoff RG, Johansson JS, Wei H, Carnini A, Kang B, Wei W, Pidikiti R, Keller JM & Eckenhoff MF. (2004). Inhaled anesthetic enhancement of amyloid-beta oligomerization and cytotoxicity. *Anesthesiology* **101**, 703-709.
- Eriksson KJ & Koivikko MJ. (1997). Prevalence, classification, and severity of epilepsy and epileptic syndromes in children. *Epilepsia* **38**, 1275-1282.
- Eroglu A, Russo MJ, Bieganski R, Fowler A, Cheley S, Bayley H & Toner M. (2000). Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nat Biotechnol* **18**, 163-167.

- Eroglu A, Toner M & Toth TL. (2002). Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. *Fertil Steril* **77**, 152-158.
- Fallon L, Belanger CM, Corera AT, Kontogiannia M, Regan-Klapisz E, Moreau F, Voortman J, Haber M, Rouleau G, Thorarinsdottir T, Brice A, van Bergen En Henegouwen PM & Fon EA. (2006). A regulated interaction with the UIM protein Eps15 implicates parkin in EGF receptor trafficking and PI(3)K-Akt signalling. *Nat Cell Biol* **8**, 834-842.
- Farrer LA, Cupples LA, van Duijn CM, Kurz A, Zimmer R, Muller U, Green RC, Clarke V, Shoffner J, Wallace DC & et al. (1995). Apolipoprotein E genotype in patients with Alzheimer's disease: implications for the risk of dementia among relatives. *Ann Neurol* **38**, 797-808.
- Favitt A, Grimaldi M & Alkon DL. (2000). Prevention of beta-amyloid neurotoxicity by blockade of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *J Neurochem* **75**, 1258-1263.
- Finder VH & Glockshuber R. (2007). Amyloid-beta aggregation. *Neurodegener Dis* **4**, 13-27.
- Fleming SM, Fernagut PO & Chesselet MF. (2005). Genetic mouse models of parkinsonism: strengths and limitations. *NeuroRx* **2**, 495-503.
- Flicker L. (2010). Modifiable lifestyle risk factors for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **20**, 803-811.
- Fodale V, Quattrone D, Trecroci C, Caminiti V & Santamaria LB. (2006). Alzheimer's disease and anaesthesia: implications for the central cholinergic system. *Br J Anaesth* **97**, 445-452.
- Fodale V, Santamaria LB, Schifilliti D & Mandal PK. (2010). Anaesthetics and postoperative cognitive dysfunction: a pathological mechanism mimicking Alzheimer's disease. *Anaesthesia* **65**, 388-395.
- Forloni G, Terreni L, Bertani I, Fogliarino S, Invernizzi R, Assini A, Ribizzi G, Negro A, Calabrese E, Volonte MA, Mariani C, Franceschi M, Tabaton M & Bertoli A. (2002). Protein misfolding in Alzheimer's and Parkinson's disease: genetics and molecular mechanisms. *Neurobiol Aging* **23**, 957-976.
- Fornai F, Longone P, Ferrucci M, Lenzi P, Isidoro C, Ruggieri S & Paparelli A. (2008). Autophagy and amyotrophic lateral sclerosis: The multiple roles of lithium. *Autophagy* **4**, 527-530.
- Funayama M, Hasegawa K, Kowa H, Saito M, Tsuji S & Obata F. (2002). A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann Neurol* **51**, 296-301.
- Gaig C, Ezquerra M, Marti MJ, Munoz E, Valldeoriola F & Tolosa E. (2006). LRRK2 mutations in Spanish patients with Parkinson disease: frequency, clinical features, and incomplete penetrance. *Arch Neurol* **63**, 377-382.
- Gasparini M, Vanacore N, Schiaffini C, Brusa L, Panella M, Talarico G, Bruno G, Meco G & Lenzi GL. (2002). A case-control study on Alzheimer's disease and exposure to anesthesia. *Neurol Sci* **23**, 11-14.
- Gasser T, Muller-Myhsok B, Wszolek ZK, Oehlmann R, Calne DB, Bonifati V, Bereznoi B, Fabrizio E, Vieregge P & Horstmann RD. (1998). A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet* **18**, 262-265.
- Gauthier S. (2002). Advances in the pharmacotherapy of Alzheimer's disease. *CMAJ* **166**, 616-623.
- Geetha T & Varalakshmi P. (2001). Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. *J Ethnopharmacol* **76**, 77-80.
- Geetha T & Wooten MW. (2002). Structure and functional properties of the ubiquitin binding protein p62. *FEBS Lett* **512**, 19-24.
- Giasson BI, Forman MS, Higuchi M, Golbe LI, Graves CL, Kotzbauer PT, Trojanowski JQ & Lee VM. (2003). Initiation and synergistic fibrillization of tau and alpha-synuclein. *Science* **300**, 636-640.

- Giasson BI & Lee VM. (2003). Are ubiquitination pathways central to Parkinson's disease? *Cell* **114**, 1-8.
- Glenner GG & Wong CW. (1984). Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun* **122**, 1131-1135.
- Glenner GG, Wong CW, Quaranta V & Eanes ED. (1984). The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl Pathol* **2**, 357-369.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L & et al. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **349**, 704-706.
- Golbe LI, Di Iorio G, Bonavita V, Miller DC & Duvoisin RC. (1990). A large kindred with autosomal dominant Parkinson's disease. *Ann Neurol* **27**, 276-282.
- Goldberg MS, Fleming SM, Palacino JJ, Cepeda C, Lam HA, Bhatnagar A, Meloni EG, Wu N, Ackerson LC, Klapstein GJ, Gajendiran M, Roth BL, Chesselet MF, Maidment NT, Levine MS & Shen J. (2003). Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *J Biol Chem* **278**, 43628-43635.
- Golde TE, Dickson D & Hutton M. (2006). Filling the gaps in the abeta cascade hypothesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **3**, 421-430.
- Gotz J, Chen F, van Dorpe J & Nitsch RM. (2001). Formation of neurofibrillary tangles in P301I tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science* **293**, 1491-1495.
- Gowers W. (1900). A Clinical Lecture on Minor Epilepsy: Delivered at the National Hospital for the Paralyzed and Epileptic, November 15th, 1899. *Br Med J* **1**, 1-5.
- Gruart A, Lopez-Ramos JC, Munoz MD & Delgado-Garcia JM. (2008). Aged wild-type and APP, PS1, and APP + PS1 mice present similar deficits in associative learning and synaptic plasticity independent of amyloid load. *Neurobiol Dis* **30**, 439-450.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS & Wisniewski HM. (1986a). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* **261**, 6084-6089.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM & Binder LI. (1986b). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4913-4917.
- Gunawardena S & Goldstein LS. (2001). Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in Drosophila. *Neuron* **32**, 389-401.
- Guo JP, Arai T, Miklossy J & McGeer PL. (2006). Abeta and tau form soluble complexes that may promote self aggregation of both into the insoluble forms observed in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1953-1958.
- Guo N, Puhlev I, Brown DR, Mansbridge J & Levine F. (2000). Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nat Biotechnol* **18**, 168-171.
- Haddad GG & Ma E. (2001). Neuronal tolerance to O2 deprivation in drosophila: novel approaches using genetic models. *Neuroscientist* **7**, 538-550.
- Han BH, Zhou ML, Abousaleh F, Brendza RP, Dietrich HH, Koenigsknecht-Talboo J, Cirrito JR, Milner E, Holtzman DM & Zipfel GJ. (2008). Cerebrovascular dysfunction in amyloid precursor protein transgenic mice: contribution of soluble and insoluble amyloid-beta peptide, partial restoration via gamma-secretase inhibition. *J Neurosci* **28**, 13542-13550.
- Hansen HH, Briem T, Dzietko M, Siffringer M, Voss A, Rzeski W, Zdzisinska B, Thor F, Heumann R, Stepulak A, Bittigau P & Ikonomidou C. (2004). Mechanisms leading to disseminated apoptosis following NMDA receptor blockade in the developing rat brain. *Neurobiol Dis* **16**, 440-453.

- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H & Mizushima N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**, 885-889.
- Hardy J. (2002). Testing times for the "amyloid cascade hypothesis". *Neurobiol Aging* **23**, 1073-1074.
- Hardy J, Cai H, Cookson MR, Gwinn-Hardy K & Singleton A. (2006). Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism. *Ann Neurol* **60**, 389-398.
- Hatakeyama S, Matsumoto M, Kamura T, Murayama M, Chui DH, Planel E, Takahashi R, Nakayama KI & Takashima A. (2004a). U-box protein carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP) mediates poly-ubiquitylation preferentially on four-repeat Tau and is involved in neurodegeneration of tauopathy. *J Neurochem* **91**, 299-307.
- Hatakeyama S, Matsumoto M, Yada M & Nakayama KI. (2004b). Interaction of U-box-type ubiquitin-protein ligases (E3s) with molecular chaperones. *Genes Cells* **9**, 533-548.
- Haughey NJ, Nath A, Chan SL, Borchard AC, Rao MS & Mattson MP. (2002). Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease. *J Neurochem* **83**, 1509-1524.
- Hemmings HC, Jr., Akabas MH, Goldstein PA, Trudell JR, Orser BA & Harrison NL. (2005). Emerging molecular mechanisms of general anesthetic action. *Trends Pharmacol Sci* **26**, 503-510.
- Hendriks L, van Duijn CM, Cras P, Cruts M, Van Hul W, van Harskamp F, Warren A, McInnis MG, Antonarakis SE, Martin JJ & et al. (1992). Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nat Genet* **1**, 218-221.
- Henn IH, Bouman L, Schlehe JS, Schlierf A, Schramm JE, Wegener E, Nakaso K, Culmsee C, Berninger B, Krappmann D, Tatzelt J & Winklhofer KF. (2007). Parkin mediates neuroprotection through activation of I κ B kinase/nuclear factor- κ B signaling. *J Neurosci* **27**, 1868-1878.
- Henon H, Pasquier F & Leys D. (2006). Poststroke dementia. *Cerebrovasc Dis* **22**, 61-70.
- Hernandez F & Avila J. (2007). Tauopathies. *Cell Mol Life Sci* **64**, 2219-2233.
- Hernandez F & Avila J. (2010). Intra and extracellular protein interactions with tau. *Curr Alzheimer Res* **7**, 670-676.
- Hernandez F, Gomez de Barreda E, Fuster-Matanzo A, Lucas JJ & Avila J. (2010). GSK3: a possible link between beta amyloid peptide and tau protein. *Exp Neurol* **223**, 322-325.
- Hickman SE, Allison EK & El Khoury J. (2008). Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci* **28**, 8354-8360.
- Hicks AA, Petursson H, Jonsson T, Stefansson H, Johannsdottir HS, Sainz J, Frigge ML, Kong A, Gulcher JR, Stefansson K & Sveinbjornsdottir S. (2002). A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* **52**, 549-555.
- Horowitz JM, Myers J, Stachowiak MK & Torres G. (1999). Identification and distribution of Parkin in rat brain. *Neuroreport* **10**, 3393-3397.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, YOUNKIN S, Yang F & Cole G. (1996). Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* **274**, 99-102.
- Hung LW, Cicciotosto GD, Giannakis E, Tew DJ, Perez K, Masters CL, Cappai R, Wade JD & Barnham KJ. (2008). Amyloid-beta peptide (A β) neurotoxicity is modulated by the rate of peptide aggregation: A β dimers and trimers correlate with neurotoxicity. *J Neurosci* **28**, 11950-11958.

- Hurford E BT, Davidson K, Haspel L, Rosow, Vasallo A. (2002). *Clinical Anesthesia Procedures of the Massachusetts General Hospital*
- Icaza EE, Huang X, Fu Y, Neubig RR, Baghdoyan HA & Lydic R. (2009). Isoflurane-induced changes in righting response and breathing are modulated by RGS proteins. *Anesth Analg* **109**, 1500-1505.
- Ignatova Z & Gierasch LM. (2007). Effects of osmolytes on protein folding and aggregation in cells. *Methods Enzymol* **428**, 355-372.
- Imai Y, Soda M, Hatakeyama S, Akagi T, Hashikawa T, Nakayama KI & Takahashi R. (2002). CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol Cell* **10**, 55-67.
- Imai Y, Soda M, Inoue H, Hattori N, Mizuno Y & Takahashi R. (2001). An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* **105**, 891-902.
- Iribarren P, Chen K, Hu J, Zhang X, Gong W & Wang JM. (2005). IL-4 inhibits the expression of mouse formyl peptide receptor 2, a receptor for amyloid beta1-42, in TNF-alpha-activated microglia. *J Immunol* **175**, 6100-6106.
- Itier JM, Ibanez P, Mena MA, Abbas N, Cohen-Salmon C, Bohme GA, Laville M, Pratt J, Corti O, Pradier L, Ret G, Joubert C, Periquet M, Araujo F, Negroni J, Casarejos MJ, Canals S, Solano R, Serrano A, Gallego E, Sanchez M, Deneffe P, Benavides J, Tremp G, Rooney TA, Brice A & Garcia de Yébenes J. (2003). Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Hum Mol Genet* **12**, 2277-2291.
- Iturriaga G, Suarez R & Nova-Franco B. (2009). Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. *Int J Mol Sci* **10**, 3793-3810.
- Izmitli A, Schebor C, McGovern MP, Reddy AS, Abbott NL & de Pablo JJ. (2010). Effect of trehalose on the interaction of Alzheimer's Aβ-peptide and anionic lipid monolayers. *Biochim Biophys Acta* **1808**, 26-33.
- Jain NK & Roy I. (2008). Role of trehalose in moisture-induced aggregation of bovine serum albumin. *Eur J Pharm Biopharm* **69**, 824-834.
- Jain NK & Roy I. (2009). Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci* **18**, 24-36.
- Jelicic M, Bonebakker AE & Bonke B. (1995). Implicit memory performance of patients with Alzheimer's disease: a brief review. *Int Psychogeriatr* **7**, 385-392.
- Jenner P & Olanow CW. (1996). Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* **47**, S161-170.
- Jensen MT, Mottin MD, Cracchiolo JR, Leighty RE & Arendash GW. (2005). Lifelong immunization with human beta-amyloid (1-42) protects Alzheimer's transgenic mice against cognitive impairment throughout aging. *Neuroscience* **130**, 667-684.
- Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, Benshoff ND, Dikranian K, Zorumski CF, Olney JW & Wozniak DF. (2003). Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci* **23**, 876-882.
- Jiang H, Jiang Q & Feng J. (2004a). Parkin increases dopamine uptake by enhancing the cell surface expression of dopamine transporter. *J Biol Chem* **279**, 54380-54386.
- Jiang H, Jiang Q, Liu W & Feng J. (2006). Parkin suppresses the expression of monoamine oxidases. *J Biol Chem* **281**, 8591-8599.
- Jiang H, Ren Y, Zhao J & Feng J. (2004b). Parkin protects human dopaminergic neuroblastoma cells against dopamine-induced apoptosis. *Hum Mol Genet* **13**, 1745-1754.
- Johansson J, Weaver TE & Tjernberg LO. (2004). Proteolytic generation and aggregation of peptides from transmembrane regions: lung surfactant protein C and amyloid beta-peptide. *Cell Mol Life Sci* **61**, 326-335.

- Jonsson KI. (2007). Tardigrades as a potential model organism in space research. *Astrobiology* **7**, 757-766.
- Kandror O, DeLeon A & Goldberg AL. (2002). Trehalose synthesis is induced upon exposure of Escherichia coli to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9727-9732.
- Kar S & Quirion R. (2004). Amyloid beta peptides and central cholinergic neurons: functional interrelationship and relevance to Alzheimer's disease pathology. *Prog Brain Res* **145**, 261-274.
- Kar S, Slowikowski SP, Westaway D & Mount HT. (2004). Interactions between beta-amyloid and central cholinergic neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Psychiatry Neurosci* **29**, 427-441.
- Kawaguchi M, Furuya H & Patel PM. (2005). Neuroprotective effects of anesthetic agents. *J Anesth* **19**, 150-156.
- Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW & Glabe CG. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* **300**, 486-489.
- Keller JN, Hanni KB & Markesbery WR. (2000). Possible involvement of proteasome inhibition in aging: implications for oxidative stress. *Mech Ageing Dev* **113**, 61-70.
- Khan NL, Jain S, Lynch JM, Pavese N, Abou-Sleiman P, Holton JL, Healy DG, Gilks WP, Sweeney MG, Ganguly M, Gibbons V, Gandhi S, Vaughan J, Eunson LH, Katzenschlager R, Gayton J, Lennox G, Revesz T, Nicholl D, Bhatia KP, Quinn N, Brooks D, Lees AJ, Davis MB, Piccini P, Singleton AB & Wood NW. (2005). Mutations in the gene LRRK2 encoding dardarin (PARK8) cause familial Parkinson's disease: clinical, pathological, olfactory and functional imaging and genetic data. *Brain* **128**, 2786-2796.
- King DL, Arendash GW, Crawford F, Sterk T, Menendez J & Mullan MJ. (1999). Progressive and gender-dependent cognitive impairment in the APP(SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* **103**, 145-162.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y & Shimizu N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* **392**, 605-608.
- Kitada T, Asakawa S, Minoshima S, Mizuno Y & Shimizu N. (2000). Molecular cloning, gene expression, and identification of a splicing variant of the mouse parkin gene. *Mamm Genome* **11**, 417-421.
- Knopman DS, Petersen RC, Cha RH, Edland SD & Rocca WA. (2005). Coronary artery bypass grafting is not a risk factor for dementia or Alzheimer disease. *Neurology* **65**, 986-990.
- Ko FJ, Chiang CH, Wu CC & Wu L. (1990). Studies of neuron-specific enolase levels in serum and cerebrospinal fluid of children with neurological diseases. *Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi* **6**, 137-143.
- Ko HS, Kim SW, Sriram SR, Dawson VL & Dawson TM. (2006). Identification of far upstream element-binding protein-1 as an authentic Parkin substrate. *J Biol Chem* **281**, 16193-16196.
- Ko HS, von Coelln R, Sriram SR, Kim SW, Chung KK, Pletnikova O, Troncoso J, Johnson B, Saffary R, Goh EL, Song H, Park BJ, Kim MJ, Kim S, Dawson VL & Dawson TM. (2005). Accumulation of the authentic parkin substrate aminoacyl-tRNA synthetase cofactor, p38/JTV-1, leads to catecholaminergic cell death. *J Neurosci* **25**, 7968-7978.
- Kochl R, Hu XW, Chan EY & Tooze SA. (2006). Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic* **7**, 129-145.
- Koldamova RP, Lefterov IM, Lefterova MI & Lazo JS. (2001). Apolipoprotein A-I directly interacts with amyloid precursor protein and inhibits A beta aggregation and toxicity. *Biochemistry* **40**, 3553-3560.

- Komatsu M & Ichimura Y. (2008). [Neuronal autophagy, its defects and neurodegenerative diseases]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **53**, 2175-2181.
- Kovacs AL & Seglen PO. (1982). Inhibition of hepatocytic protein degradation by inducers of autophagosome accumulation. *Acta Biol Med Ger* **41**, 125-130.
- Kudo M, Aono M, Lee Y, Massey G, Pearlstein RD & Warner DS. (2001). Effects of volatile anesthetics on N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in primary rat neuronal-glia cultures. *Anesthesiology* **95**, 756-765.
- Kumar P, Ambasta RK, Veereshwarayya V, Rosen KM, Kosik KS, Band H, Mestril R, Patterson C & Querfurth HW. (2007). CHIP and HSPs interact with {beta}-APP in a proteasome-dependent manner and influence A{beta} metabolism. *Hum Mol Genet* **16**, 848-864.
- Kuroda Y, Mitsui T, Kunishige M, Shono M, Akaike M, Azuma H & Matsumoto T. (2006). Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. *Hum Mol Genet* **15**, 883-895.
- Kuusisto E, Salminen A & Alafuzoff I. (2002). Early accumulation of p62 in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease: possible role in tangle formation. *Neuropathol Appl Neurobiol* **28**, 228-237.
- Kvolik S, Glavas-Obrovac L, Bares V & Karner I. (2005). Effects of inhalation anesthetics halothane, sevoflurane, and isoflurane on human cell lines. *Life Sci* **77**, 2369-2383.
- Kwok JB, Hallupp M, Loy CT, Chan DK, Woo J, Mellick GD, Buchanan DD, Silburn PA, Halliday GM & Schofield PR. (2005). GSK3B polymorphisms alter transcription and splicing in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **58**, 829-839.
- Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, Viola KL & Klein WL. (2007). Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **27**, 796-807.
- Lagasse RS. (2002). Anesthesia safety: model or myth? A review of the published literature and analysis of current original data. *Anesthesiology* **97**, 1609-1617.
- Lalonde R. (2002). The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci Biobehav Rev* **26**, 91-104.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW & Irwin I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* **219**, 979-980.
- Lansbury PT, Jr. & Brice A. (2002). Genetics of Parkinson's disease and biochemical studies of implicated gene products. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 299-306.
- Lavedan C, Buchholtz S, Nussbaum RL, Albin RL & Polymeropoulos MH. (2002). A mutation in the human neurofilament M gene in Parkinson's disease that suggests a role for the cytoskeleton in neuronal degeneration. *Neurosci Lett* **322**, 57-61.
- LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Weihofen A, Schlossmacher MG & Selkoe DJ. (2005). Dopamine covalently modifies and functionally inactivates parkin. *Nat Med* **11**, 1214-1221.
- Layfield R & Shaw B. (2007). Ubiquitin-mediated signalling and Paget's disease of bone. *BMC Biochem* **8 Suppl 1**, S5.
- Le WD, Xu P, Jankovic J, Jiang H, Appel SH, Smith RG & Vassilatis DK. (2003). Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nat Genet* **33**, 85-89.
- Le Y, Gong W, Tiffany HL, Tumanov A, Nedospasov S, Shen W, Dunlop NM, Gao JL, Murphy PM, Oppenheim JJ & Wang JM. (2001). Amyloid (beta)42 activates a G-protein-coupled chemoattractant receptor, FPR-like-1. *J Neurosci* **21**, RC123.
- LeBlanc AC. (2005). The role of apoptotic pathways in Alzheimer's disease neurodegeneration and cell death. *Curr Alzheimer Res* **2**, 389-402.
- Lee A & Gin T. (2005). Educating patients about anaesthesia: effect of various modes on patients' knowledge, anxiety and satisfaction. *Curr Opin Anaesthesiol* **18**, 205-208.

- Lee HJ, Khoshaghideh F, Lee S & Lee SJ. (2006). Impairment of microtubule-dependent trafficking by overexpression of alpha-synuclein. *Eur J Neurosci* **24**, 3153-3162.
- Lee TA, Wolozin B, Weiss KB & Bednar MM. (2005). Assessment of the emergence of Alzheimer's disease following coronary artery bypass graft surgery or percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Alzheimers Dis* **7**, 319-324.
- Lee VM. (2002). Amyloid binding ligands as Alzheimer's disease therapies. *Neurobiol Aging* **23**, 1039-1042.
- Lemaire HG, Salbaum JM, Multhaup G, Kang J, Bayney RM, Unterbeck A, Beyreuther K & Muller-Hill B. (1989). The PreA4(695) precursor protein of Alzheimer's disease A4 amyloid is encoded by 16 exons. *Nucleic Acids Res* **17**, 517-522.
- Leroy E, Boyer R & Polymeropoulos MH. (1998). Intron-exon structure of ubiquitin c-terminal hydrolase-L1. *DNA Res* **5**, 397-400.
- LeVine H. (2002). The challenge of inhibiting Abeta polymerization. *Curr Med Chem* **9**, 1121-1133.
- Lewczuk P, Esselmann H, Otto M, Maler JM, Henkel AW, Henkel MK, Eikenberg O, Antz C, Krause WR, Reulbach U, Kornhuber J & Wiltfang J. (2004). Neurochemical diagnosis of Alzheimer's dementia by CSF Abeta42, Abeta42/Abeta40 ratio and total tau. *Neurobiol Aging* **25**, 273-281.
- Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M & McGowan E. (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* **293**, 1487-1491.
- Li W, Lesuisse C, Xu Y, Troncoso JC, Price DL & Lee MK. (2004). Stabilization of alpha-synuclein protein with aging and familial parkinson's disease-linked A53T mutation. *J Neurosci* **24**, 7400-7409.
- Liang G, Wang Q, Li Y, Kang B, Eckenhoﬀ MF, Eckenhoﬀ RG & Wei H. (2008). A presenilin-1 mutation renders neurons vulnerable to isoflurane toxicity. *Anesth Analg* **106**, 492-500, table of contents.
- Liao WH & Wang WJ. (2004). [The inflammation in Alzheimer's disease]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* **35**, 181-184.
- Liu JL, Sheng X, Hortobagyi ZK, Mao Z, Gallick GE & Yung WK. (2005a). Nuclear PTEN-mediated growth suppression is independent of Akt down-regulation. *Mol Cell Biol* **25**, 6211-6224.
- Liu R, Barkhordarian H, Emadi S, Park CB & Sierks MR. (2005b). Trehalose differentially inhibits aggregation and neurotoxicity of beta-amyloid 40 and 42. *Neurobiol Dis* **20**, 74-81.
- Liu WM, Wang XB, Pu FC & Huang NN. (1996). Nonlinear dynamics of the magnetization in an anisotropic ferromagnet with a magnetic field. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* **54**, 4612-4625.
- Lord A, Englund H, Soderberg L, Tucker S, Clausen F, Hillered L, Gordon M, Morgan D, Lannfelt L, Pettersson FE & Nilsson LN. (2009). Amyloid-beta protofibril levels correlate with spatial learning in Arctic Alzheimer's disease transgenic mice. *Febs J* **276**, 995-1006.
- Ma WP, Cao J, Tian M, Cui MH, Han HL, Yang YX & Xu L. (2007). Exposure to chronic constant light impairs spatial memory and influences long-term depression in rats. *Neurosci Res* **59**, 224-230.
- MacLeod D, Dowman J, Hammond R, Leete T, Inoue K & Abeliovich A. (2006). The familial Parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology. *Neuron* **52**, 587-593.
- Maezawa I, Jin LW, Woltjer RL, Maeda N, Martin GM, Montine TJ & Montine KS. (2004). Apolipoprotein E isoforms and apolipoprotein AI protect from amyloid precursor protein carboxy terminal fragment-associated cytotoxicity. *J Neurochem* **91**, 1312-1321.

- Magrane J, Smith RC, Walsh K & Querfurth HW. (2004). Heat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed beta-amyloid in neurons. *J Neurosci* **24**, 1700-1706.
- Mandal PK. (2007). Molecular understanding of Abeta peptide interaction with isoflurane, propofol, and thiopental: NMR spectroscopic study. *Biochemistry* **46**, 12887.
- Mandal PK & Pettegrew JW. (2008a). Abeta peptide interactions with isoflurane, propofol, thiopental and combined thiopental with halothane: a NMR study. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 2633-2639.
- Mandal PK & Pettegrew JW. (2008b). Clinically relevant concentration determination of inhaled anesthetics (halothane, isoflurane, sevoflurane, and desflurane) by 19F NMR. *Cell Biochem Biophys* **52**, 31-35.
- Mandal PK, Pettegrew JW, Masliah E, Hamilton RL & Mandal R. (2006). Interaction between Abeta peptide and alpha synuclein: molecular mechanisms in overlapping pathology of Alzheimer's and Parkinson's in dementia with Lewy body disease. *Neurochem Res* **31**, 1153-1162.
- Mandal PK, Simplaceanu V & Fodale V. (2010). Intravenous anesthetic diazepam does not induce amyloid-beta peptide oligomerization but diazepam co-administered with halothane oligomerizes amyloid-beta peptide: an NMR study. *J Alzheimers Dis* **20**, 127-134.
- Mandal PK, Williams JP & Mandal R. (2007). Molecular understanding of Abeta peptide interaction with isoflurane, propofol, and thiopental: NMR spectroscopic study. *Biochemistry* **46**, 762-771.
- Marcantonio ER, Goldman L, Mangione CM, Ludwig LE, Muraca B, Haslauer CM, Donaldson MC, Whittemore AD, Sugarbaker DJ, Poss R & et al. (1994). A clinical prediction rule for delirium after elective noncardiac surgery. *JAMA* **271**, 134-139.
- Marongiu R, Brancati F, Antonini A, Ialongo T, Ceccarini C, Scarciolla O, Capalbo A, Benti R, Pezzoli G, Dallapiccola B, Goldwurm S & Valente EM. (2007). Whole gene deletion and splicing mutations expand the PINK1 genotypic spectrum. *Hum Mutat* **28**, 98.
- Marttila RJ, Kaprio J, Koskenvuo M & Rinne UK. (1988). Parkinson's disease in a nationwide twin cohort. *Neurology* **38**, 1217-1219.
- Marx FP, Holzmann C, Strauss KM, Li L, Eberhardt O, Gerhardt E, Cookson MR, Hernandez D, Farrer MJ, Kachergus J, Engelender S, Ross CA, Berger K, Schols L, Schulz JB, Riess O & Kruger R. (2003). Identification and functional characterization of a novel R621C mutation in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* **12**, 1223-1231.
- McGowan E, Eriksen J & Hutton M. (2006). A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice. *Trends Genet* **22**, 281-289.
- Meek PD, McKeithan K & Schumock GT. (1998). Economic considerations in Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy* **18**, 68-73; discussion 79-82.
- Mena I, Court J, Fuenzalida S, Papavasiliou PS & Cotzias GC. (1970). Modification of chronic manganese poisoning. Treatment with L-dopa or 5-OH tryptophane. *N Engl J Med* **282**, 5-10.
- Mena MA & de Yebenes JG. (2006). Drug-induced parkinsonism. *Expert Opin Drug Saf* **5**, 759-771.
- Mena MA, Garcia de Yebenes MJ, Tabernero C, Casarejos MJ, Pardo B & Garcia de Yebenes J. (1995). Effects of calcium antagonists on the dopamine system. *Clin Neuropharmacol* **18**, 410-426.
- Mena MA, Perucho J, Rubio I & de Yebenes JG. (2010). Studies in animal models of the effects of anesthetics on behavior, biochemistry, and neuronal cell death. *J Alzheimers Dis* **22**, 43-48.
- Mena MA, Rodriguez-Navarro JA & García de Yébenes J. (2009). The multiple mechanisms of amyloid deposition. *Prion* **3**.

- Menendez J, Rodriguez-Navarro JA, Solano RM, Casarejos MJ, Rodal I, Guerrero R, Sanchez MP, Avila J, Mena MA & de Yebenes JG. (2006). Suppression of Parkin enhances nigrostriatal and motor neuron lesion in mice over-expressing human-mutated tau protein. *Hum Mol Genet* **15**, 2045-2058.
- Merker K, Sitte N & Grune T. (2000). Hydrogen peroxide-mediated protein oxidation in young and old human MRC-5 fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* **375**, 50-54.
- Mielke MM, Rosenberg PB, Tschanz J, Cook L, Corcoran C, Hayden KM, Norton M, Rabins PV, Green RC, Welsh-Bohmer KA, Breitner JC, Munger R & Lyketsos CG. (2007). Vascular factors predict rate of progression in Alzheimer disease. *Neurology* **69**, 1850-1858.
- Miller D CE, Miller D Jr, Reves G, Roizen E, Savarese J. (1994). *Anesthesia*. Churchill Livingstone, New York.
- Mizushima N & Kuma A. (2008). Autophagosomes in GFP-LC3 Transgenic Mice. *Methods Mol Biol* **445**, 119-124.
- Mizushima N & Yoshimori T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* **3**, 542-545.
- Moller JT, Cluitmans P, Rasmussen LS, Houx P, Rasmussen H, Canet J, Rabbitt P, Jolles J, Larsen K, Hanning CD, Langeron O, Johnson T, Lauven PM, Kristensen PA, Biedler A, van Beem H, Fraidakis O, Silverstein JH, Beneken JE & Gravenstein JS. (1998). Long-term postoperative cognitive dysfunction in the elderly ISPOCD1 study. ISPOCD investigators. International Study of Post-Operative Cognitive Dysfunction. *Lancet* **351**, 857-861.
- Monk TG, Weldon BC, Garvan CW, Dede DE, van der Aa MT, Heilman KM & Gravenstein JS. (2008). Predictors of cognitive dysfunction after major noncardiac surgery. *Anesthesiology* **108**, 18-30.
- Moore DJ, Dawson VL & Dawson TM. (2003). Role for the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease and other neurodegenerative brain amyloidoses. *Neuromolecular Med* **4**, 95-108.
- Moreira PI, Sayre LM, Zhu X, Nunomura A, Smith MA & Perry G. (2010). Detection and localization of markers of oxidative stress by in situ methods: application in the study of Alzheimer disease. *Methods Mol Biol* **610**, 419-434.
- Morelli L CE. (2008). Proteínas Anormales en la Enfermedad de Alzheimer. *CienciaHoy* **7**, <http://www.cienciahoy.org.ar/hoy41/protei43.htm>.
- Morett E & Bork P. (1999). A novel transactivation domain in parkin. *Trends Biochem Sci* **24**, 229-231.
- Moretti L, Cha YI, Niermann KJ & Lu B. (2007). Switch between apoptosis and autophagy: radiation-induced endoplasmic reticulum stress? *Cell Cycle* **6**, 793-798.
- Mott RT & Hulette CM. (2005). Neuropathology of Alzheimer's disease. *Neuroimaging Clin N Am* **15**, 755-765, ix.
- Mouri A, Noda Y, Hara H, Mizoguchi H, Tabira T & Nabeshima T. (2007). Oral vaccination with a viral vector containing Abeta cDNA attenuates age-related Abeta accumulation and memory deficits without causing inflammation in a mouse Alzheimer model. *Faseb J* **21**, 2135-2148.
- Muqit MM, Davidson SM, Payne Smith MD, MacCormac LP, Kahns S, Jensen PH, Wood NW & Latchman DS. (2004). Parkin is recruited into aggresomes in a stress-specific manner: over-expression of parkin reduces aggresome formation but can be dissociated from parkin's effect on neuronal survival. *Hum Mol Genet* **13**, 117-135.
- Murata S, Minami Y, Minami M, Chiba T & Tanaka K. (2001). CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep* **2**, 1133-1138.
- Narendra D, Tanaka A, Suen DF & Youle RJ. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* **183**, 795-803.

- Newman MF. (2007). Open heart surgery and cognitive decline. *Cleve Clin J Med* **74** Suppl 1, S52-55.
- Newman S, Stygall J, Hirani S, Shaefi S & Maze M. (2007). Postoperative cognitive dysfunction after noncardiac surgery: a systematic review. *Anesthesiology* **106**, 572-590.
- Nunan J, Shearman MS, Checler F, Cappai R, Evin G, Beyreuther K, Masters CL & Small DH. (2001). The C-terminal fragment of the Alzheimer's disease amyloid protein precursor is degraded by a proteasome-dependent mechanism distinct from gamma-secretase. *Eur J Biochem* **268**, 5329-5336.
- Nunan J, Williamson NA, Hill AF, Sernee MF, Masters CL & Small DH. (2003). Proteasome-mediated degradation of the C-terminus of the Alzheimer's disease beta-amyloid protein precursor: effect of C-terminal truncation on production of beta-amyloid protein. *J Neurosci Res* **74**, 378-385.
- O'Nuallain B, Freir DB, Nicoll AJ, Risse E, Ferguson N, Herron CE, Collinge J & Walsh DM. (2010). Amyloid beta-protein dimers rapidly form stable synaptotoxic protofibrils. *J Neurosci* **30**, 14411-14419.
- Oddo S, Billings L, Kesslak JP, Cribbs DH & LaFerla FM. (2004). Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. *Neuron* **43**, 321-332.
- Oddo S, Caccamo A, Cheng D, Juleh B, Torp R & LaFerla FM. (2007). Genetically augmenting tau levels does not modulate the onset or progression of Abeta pathology in transgenic mice. *J Neurochem* **102**, 1053-1063.
- Oddo S, Caccamo A, Tseng B, Cheng D, Vasilevko V, Cribbs DH & LaFerla FM. (2008). Blocking Abeta42 accumulation delays the onset and progression of tau pathology via the C terminus of heat shock protein70-interacting protein: a mechanistic link between Abeta and tau pathology. *J Neurosci* **28**, 12163-12175.
- Oddo S, Vasilevko V, Caccamo A, Kitazawa M, Cribbs DH & LaFerla FM. (2006). Reduction of soluble Abeta and tau, but not soluble Abeta alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. *J Biol Chem* **281**, 39413-39423.
- Okui M, Yamaki A, Takayanagi A, Kudoh J, Shimizu N & Shimizu Y. (2005). Transcription factor single-minded 2 (SIM2) is ubiquitinated by the RING-IBR-RING-type E3 ubiquitin ligases. *Exp Cell Res* **309**, 220-228.
- Olzmann JA, Brown K, Wilkinson KD, Rees HD, Huai Q, Ke H, Levey AI, Li L & Chin LS. (2004). Familial Parkinson's disease-associated L166P mutation disrupts DJ-1 protein folding and function. *J Biol Chem* **279**, 8506-8515.
- Ouyang W, Jih TY, Zhang TT, Correa AM & Hemmings HC, Jr. (2007). Isoflurane inhibits NaChBac, a prokaryotic voltage-gated sodium channel. *J Pharmacol Exp Ther* **322**, 1076-1083.
- Paiva CL & Panek AD. (1996). Biotechnological applications of the disaccharide trehalose. *Biotechnol Annu Rev* **2**, 293-314.
- Palacino JJ, Sagi D, Goldberg MS, Krauss S, Motz C, Wacker M, Klose J & Shen J. (2004). Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem* **279**, 18614-18622.
- Palotas M, Palotas A, Bjelik A, Pakaski M, Hugyecz M, Janka Z & Kalman J. (2005). Effect of general anesthetics on amyloid precursor protein and mRNA levels in the rat brain. *Neurochem Res* **30**, 1021-1026.
- Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, Halter C, Rudolph A, Shults C, Conneally PM & Foroud T. (2003). Significant linkage of Parkinson disease to chromosome 2q36-37. *Am J Hum Genet* **72**, 1053-1057.
- Paris D, Town T, Parker TA, Tan J, Humphrey J, Crawford F & Mullan M. (1999). Inhibition of Alzheimer's beta-amyloid induced vasoactivity and proinflammatory response in microglia by a cGMP-dependent mechanism. *Exp Neurol* **157**, 211-221.

- Pastor MT, Esteras-Chopo A & Serrano L. (2007). Hacking the code of amyloid formation: the amyloid stretch hypothesis. *Prion* **1**, 9-14.
- Pastor P, Ezquerro M, Munoz E, Marti MJ, Blesa R, Tolosa E & Oliva R. (2000). Significant association between the tau gene A0/A0 genotype and Parkinson's disease. *Ann Neurol* **47**, 242-245.
- Payami H, Zarepari S, Montee KR, Sexton GJ, Kaye JA, Bird TD, Yu CE, Wijsman EM, Heston LL, Litt M & Schellenberg GD. (1996). Gender difference in apolipoprotein E-associated risk for familial Alzheimer disease: a possible clue to the higher incidence of Alzheimer disease in women. *Am J Hum Genet* **58**, 803-811.
- Peretz C, Alexander BH, Nagahama SI, Domino KB & Checkoway H. (2005). Parkinson's disease mortality among male anesthesiologists and internists. *Mov Disord* **20**, 1614-1617.
- Perez FA & Palmiter RD. (2005). Parkin-deficient mice are not a robust model of parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2174-2179.
- Perouansky M. (2008). General anesthetics and long-term neurotoxicity. *Handb Exp Pharmacol*, 143-157.
- Perucho J, Rubio I, Casarejos MJ, Gomez A, Rodriguez-Navarro JA, Solano RM, De Yebenes JG & Mena MA. (2010a). Anesthesia with isoflurane increases amyloid pathology in mice models of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **19**, 1245-1257.
- Perucho J, Rubio I, Casarejos MJ, Gomez A, Rodriguez-Navarro JA, Solano RM, De Yebenes JG & Mena MA. (2010b). Response. *J Alzheimers Dis* **19**, 1261.
- Petrucelli L, Dickson D, Kehoe K, Taylor J, Snyder H, Grover A, De Lucia M, McGowan E, Lewis J, Prihar G, Kim J, Dillmann WH, Browne SE, Hall A, Voellmy R, Tsuboi Y, Dawson TM, Wolozin B, Hardy J & Hutton M. (2004). CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation. *Hum Mol Genet* **13**, 703-714.
- Pham TM, Hagman B, Codita A, Van Loo PL, Strommer L & Baumans V. (2010). Housing environment influences the need for pain relief during post-operative recovery in mice. *Physiol Behav* **99**, 663-668.
- Pickford F, Masliah E, Britschgi M, Lucin K, Narasimhan R, Jaeger PA, Small S, Spencer B, Rockenstein E, Levine B & Wyss-Coray T. (2008). The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J Clin Invest* **118**, 2190-2199.
- Planel E, Krishnamurthy P, Miyasaka T, Liu L, Herman M, Kumar A, Bretteville A, Figueroa HY, Yu WH, Whittington RA, Davies P, Takashima A, Nixon RA & Duff KE. (2008). Anesthesia-induced hyperphosphorylation detaches 3-repeat tau from microtubules without affecting their stability in vivo. *J Neurosci* **28**, 12798-12807.
- Planel E, Richter KE, Nolan CE, Finley JE, Liu L, Wen Y, Krishnamurthy P, Herman M, Wang L, Schachter JB, Nelson RB, Lau LF & Duff KE. (2007). Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. *J Neurosci* **27**, 3090-3097.
- Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, Johnson WG, Ide SE, Di Iorio G, Sanges G, Stenroos ES, Pho LT, Schaffer AA, Lazzarini AM, Nussbaum RL & Duvoisin RC. (1996). Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science* **274**, 1197-1199.
- Ponomarev ED, Maresz K, Tan Y & Dittel BN. (2007). CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. *J Neurosci* **27**, 10714-10721.
- Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA & Herms J. (2006). Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci* **26**, 7212-7221.

- Qi GJ, Hua XS, Rui Y, Tang J & Zhang HJ. (2009). Two-dimensional multilabel active learning with an efficient online adaptation model for image classification. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell* **31**, 1880-1897.
- Qian SB, McDonough H, Boellmann F, Cyr DM & Patterson C. (2006). CHIP-mediated stress recovery by sequential ubiquitination of substrates and Hsp70. *Nature* **440**, 551-555.
- Qiang Liu RKS, B. Teo, P. A. Karplus and J. W. Brady. (1997). Molecular Dynamics Studies of the Hydration of α,α -Trehalose. *J Am Chem Soc* **119**, 7851-7862.
- Quasha AL, Eger EI, 2nd & Tinker JH. (1980). Determination and applications of MAC. *Anesthesiology* **53**, 315-334.
- Rajput A, Dickson DW, Robinson CA, Ross OA, Dachsel JC, Lincoln SJ, Cobb SA, Rajput ML & Farrer MJ. (2006). Parkinsonism, Lrrk2 G2019S, and tau neuropathology. *Neurology* **67**, 1506-1508.
- Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP & Ferreira A. (2002). Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6364-6369.
- Rasmussen KG, Laurila DR, Brady BM, Lewis CL, Niemeyer KD, Sun NM, Marienau ME, Hooten WM, Schroeder DR & Spackman TM. (2006). Seizure length with sevoflurane and thiopental for induction of general anesthesia in electroconvulsive therapy: a randomized double-blind trial. *J ECT* **22**, 240-242.
- Rasmussen LS. (2006). Postoperative cognitive dysfunction: incidence and prevention. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* **20**, 315-330.
- Rau V, Oh I, Laster M, Eger EI, 2nd & Fanselow MS. (2009). Isoflurane suppresses stress-enhanced fear learning in a rodent model of post-traumatic stress disorder. *Anesthesiology* **110**, 487-495.
- Ravikumar B & Rubinsztein DC. (2004). Can autophagy protect against neurodegeneration caused by aggregate-prone proteins? *Neuroreport* **15**, 2443-2445.
- Ravikumar B, Stewart A, Kita H, Kato K, Duden R & Rubinsztein DC. (2003). Raised intracellular glucose concentrations reduce aggregation and cell death caused by mutant huntingtin exon 1 by decreasing mTOR phosphorylation and inducing autophagy. *Hum Mol Genet* **12**, 985-994.
- Reddy AS, Izmitli A & de Pablo JJ. (2009). Effect of trehalose on amyloid beta (29-40)-membrane interaction. *J Chem Phys* **131**, 085101.
- Ren Y, Zhao J & Feng J. (2003). Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *J Neurosci* **23**, 3316-3324.
- Richards AB, Krakowka S, Dexter LB, Schmid H, Wolterbeek AP, Waalkens-Berendsen DH, Shigoyuki A & Kurimoto M. (2002). Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food Chem Toxicol* **40**, 871-898.
- Ritchie K, Carriere I, Ritchie CW, Berr C, Artero S & Ancelin ML. (2010). Designing prevention programmes to reduce incidence of dementia: prospective cohort study of modifiable risk factors. *BMJ* **341**, c3885.
- Roberson ED, Scarce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ & Mucke L. (2007). Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* **316**, 750-754.
- Rodriguez-Navarro JA, Casarejos MJ, Menendez J, Solano RM, Rodal I, Gomez A, Yebenes JG & Mena MA. (2007). Mortality, oxidative stress and tau accumulation during ageing in parkin null mice. *J Neurochem* **103**, 98-114.
- Rodriguez-Navarro JA, Gomez A, Rodal I, Peruchó J, Martínez A, Furio V, Ampuero I, Casarejos MJ, Solano RM, de Yebenes JG & Mena MA. (2008). Parkin deletion causes cerebral and systemic amyloidosis in human mutated tau over-expressing mice. *Hum Mol Genet* **17**, 3128-3143.
- Rodriguez-Navarro JA, Rodriguez L, Casarejos MJ, Solano RM, Gomez A, Peruchó J, Cuervo AM, Garcia de Yebenes J & Mena MA. (2010). Trehalose ameliorates

- dopaminergic and tau pathology in parkin deleted/tau overexpressing mice through autophagy activation. *Neurobiol Dis* **39**, 423-438.
- Rohn TT, Vyas V, Hernandez-Estrada T, Nichol KE, Christie LA & Head E. (2008). Lack of pathology in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease after overexpression of the anti-apoptotic protein Bcl-2. *J Neurosci* **28**, 3051-3059.
- Rosen KM, Veereshwarayya V, Moussa CE, Fu Q, Goldberg MS, Schlossmacher MG, Shen J & Querfurth HW. (2006). Parkin protects against mitochondrial toxins and beta-amyloid accumulation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* **281**, 12809-12816.
- Rubio A, Perez M & Avila J. (2006). Acetylcholine receptors and tau phosphorylation. *Curr Mol Med* **6**, 423-428.
- Rudolph AS, Crowe JH & Crowe LM. (1986). Effects of three stabilizing agents--proline, betaine, and trehalose--on membrane phospholipids. *Arch Biochem Biophys* **245**, 134-143.
- Rudolph U & Antkowiak B. (2004). Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. *Nat Rev Neurosci* **5**, 709-720.
- Run X, Liang Z, Zhang L, Iqbal K, Grundke-Iqbal I & Gong CX. (2009). Anesthesia induces phosphorylation of tau. *J Alzheimers Dis* **16**, 619-626.
- Sahara N, Murayama M, Mizoroki T, Urushitani M, Imai Y, Takahashi R, Murata S, Tanaka K & Takashima A. (2005). In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation. *J Neurochem* **94**, 1254-1263.
- Saidman LJ, Eger EI, 2nd, Munson ES, Babad AA & Muallem M. (1967). Minimum alveolar concentrations of methoxyflurane, halothane, ether and cyclopropane in man: correlation with theories of anesthesia. *Anesthesiology* **28**, 994-1002.
- Santos SD, Cardoso I, Magalhaes J & Saraiva MJ. (2007). Impairment of the ubiquitin-proteasome system associated with extracellular transthyretin aggregates in familial amyloidotic polyneuropathy. *J Pathol* **213**, 200-209.
- Sarkar S, Davies JE, Huang Z, Tunnacliffe A & Rubinsztein DC. (2007). Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J Biol Chem* **282**, 5641-5652.
- Sarkar S, Floto RA, Berger Z, Imarisio S, Cordenier A, Pasco M, Cook LJ & Rubinsztein DC. (2005). Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J Cell Biol* **170**, 1101-1111.
- Sarkar S, Krishna G, Imarisio S, Saiki S, O'Kane CJ & Rubinsztein DC. (2008). A rational mechanism for combination treatment of Huntington's disease using lithium and rapamycin. *Hum Mol Genet* **17**, 170-178.
- Sarkar S & Rubinsztein DC. (2008). Small molecule enhancers of autophagy for neurodegenerative diseases. *Mol Biosyst* **4**, 895-901.
- Savva GM, Wharton SB, Ince PG, Forster G, Matthews FE & Brayne C. (2009). Age, neuropathology, and dementia. *N Engl J Med* **360**, 2302-2309.
- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P & Marsden CD. (1990). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* **54**, 823-827.
- Schifilliti D, Santamaria LB, Rosa G, Di Nino G, Mandal PK & Fodale V. (2010). Cholinergic central system, Alzheimer's disease, and anesthetics liaison: a vicious circle? *J Alzheimers Dis* **22 Suppl 3**, 35-41.
- Schubert D, LaCorbiere M, Saitoh T & Cole G. (1989). Characterization of an amyloid beta precursor protein that binds heparin and contains tyrosine sulfate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2066-2069.
- Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW & Bennink JR. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* **404**, 770-774.

- Schwendeman SP, Costantino HR, Gupta RK, Siber GR, Klibanov AM & Langer R. (1995). Stabilization of tetanus and diphtheria toxoids against moisture-induced aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11234-11238.
- Selkoe DJ. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* **81**, 741-766.
- Seto-Salvia N & Clarimon J. (2010). [Genetics of Alzheimer's disease]. *Rev Neurol* **50**, 360-364.
- Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C & et al. (1992). Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* **359**, 325-327.
- Seymour DG & Severn AM. (2009). Cognitive dysfunction after surgery and anaesthesia: what can we tell the grandparents? *Age Ageing* **38**, 147-150.
- Shadrina MI, Slominsky PA & Limborska SA. (2010). Molecular mechanisms of pathogenesis of Parkinson's disease. *Int Rev Cell Mol Biol* **281**, 229-266.
- Shendelman S, Jonason A, Martinat C, Leete T & Abeliovich A. (2004). DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. *PLoS Biol* **2**, e362.
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K & Suzuki T. (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* **25**, 302-305.
- Shimura H, Schwartz D, Gygi SP & Kosik KS. (2004). CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival. *J Biol Chem* **279**, 4869-4876.
- Shin Y, Klucken J, Patterson C, Hyman BT & McLean PJ. (2005). The co-chaperone carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) mediates alpha-synuclein degradation decisions between proteasomal and lysosomal pathways. *J Biol Chem* **280**, 23727-23734.
- Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, McKay DM, Tintner R, Frangione B & et al. (1992). Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* **258**, 126-129.
- Simard AR & Rivest S. (2006a). [Bone marrow stem cells to the rescue of Alzheimer's disease]. *Med Sci (Paris)* **22**, 822-824.
- Simard AR & Rivest S. (2006b). Neuroprotective properties of the innate immune system and bone marrow stem cells in Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* **11**, 327-335.
- Simola M, Hanninen AL, Stranius SM & Makarow M. (2000). Trehalose is required for conformational repair of heat-denatured proteins in the yeast endoplasmic reticulum but not for maintenance of membrane traffic functions after severe heat stress. *Mol Microbiol* **37**, 42-53.
- Simon AM, Frechilla D & del Rio J. (2010). [Perspectives on the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease]. *Rev Neurol* **50**, 667-675.
- Singer MA & Lindquist S. (1998). Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol* **16**, 460-468.
- Skovronsky DM, Pijak DS, Doms RW & Lee VM. (2000). A distinct ER/IC gamma-secretase competes with the proteasome for cleavage of APP. *Biochemistry* **39**, 810-817.
- Sola-Penna M & Meyer-Fernandes JR. (1996). Trehalose protects yeast pyrophosphatase against structural and functional damage induced by guanidinium chloride. *Z Naturforsch C* **51**, 160-164.
- Solano RM, Menendez J, Casarejos MJ, Rodriguez-Navarro JA, Garcia de Yébenes J & Mena MA. (2006). Midbrain neuronal cultures from parkin mutant mice are resistant to nitric oxide-induced toxicity. *Neuropharmacology* **51**, 327-340.
- Sonner JM, Zhang Y, Stabernack C, Abaigar W, Xing Y & Laster MJ. (2003). GABA(A) receptor blockade antagonizes the immobilizing action of propofol but not

- ketamine or isoflurane in a dose-related manner. *Anesth Analg* **96**, 706-712, table of contents.
- Soriano SG & Anand KJ. (2005). Anesthetics and brain toxicity. *Curr Opin Anaesthesiol* **18**, 293-297.
- Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, Burton MA, Goldstein LE, Duong S, Tanzi RE & Moir RD. (2010). The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One* **5**, e9505.
- Stozicka Z, Zilka N & Novak M. (2007). Risk and protective factors for sporadic Alzheimer's disease. *Acta Virol* **51**, 205-222.
- Stratmann G, Sall JW, Bell JS, Alvi RS, May LV, Ku B, Dowlatsahi M, Dai R, Bickler PE, Russell I, Lee MT, Hrubos MW & Chiu C. (2010). Isoflurane does not affect brain cell death, hippocampal neurogenesis, or long-term neurocognitive outcome in aged rats. *Anesthesiology* **112**, 305-315.
- Streit WJ. (2010). Microglial activation and neuroinflammation in Alzheimer's disease: a critical examination of recent history. *Front Aging Neurosci* **2**, 22.
- Stumptner C, Heid H, Zatloukal K, Fuchsbichler A, Hauser H & Denk H. (1999). Identification of p62, a phosphotyrosine independent ligand of p56lck kinase, as a major component of intracytoplasmic hyaline bodies in hepatocellular carcinoma. *Verh Dtsch Ges Pathol* **83**, 254-259.
- Suarez R, Wong A, Ramirez M, Barraza A, Orozco Mdel C, Cevallos MA, Lara M, Hernandez G & Iturriaga G. (2008). Improvement of drought tolerance and grain yield in common bean by overexpressing trehalose-6-phosphate synthase in rhizobia. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 958-966.
- Sun S, Beard C, Jaenisch R, Jones P & Sprent J. (1997). Mitogenicity of DNA from different organisms for murine B cells. *J Immunol* **159**, 3119-3125.
- Sussich F, Skopec C, Brady J & Cesaro A. (2001). Reversible dehydration of trehalose and anhydrobiosis: from solution state to an exotic crystal? *Carbohydr Res* **334**, 165-176.
- Tampellini D & Gouras GK. (2010). Synapses, synaptic activity and intraneuronal abeta in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* **2**.
- Tanaka M, Machida Y, Niu S, Ikeda T, Jana NR, Doi H, Kurosawa M, Nekooki M & Nukina N. (2004). Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nat Med* **10**, 148-154.
- Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T & Kominami E. (2005). Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* **1**, 84-91.
- Tanzi RE & Bertram L. (2005). Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* **120**, 545-555.
- Thornberry NA. (1999). Caspases: a decade of death research. *Cell Death Differ* **6**, 1023-1027.
- Timasheff SN. (1993). The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **22**, 67-97.
- Torres M AL, de Andrés A, de León O, Gómez-Luque A, Montero A. (2001). *Tratado de Anestesia y Reanimación*. Ediciones ARAN, Madrid.
- Turner CA, Presti MF, Newman HA, Bugenhagen P, Crnic L & Lewis MH. (2001). Spontaneous stereotypy in an animal model of Down syndrome: Ts65Dn mice. *Behav Genet* **31**, 393-400.
- Turner PR, O'Connor K, Tate WP & Abraham WC. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol* **70**, 1-32.
- Unschuld PG, Dachsel J, Darios F, Kohlmann A, Casademunt E, Lehmann-Horn K, Dichgans M, Ruberg M, Brice A, Gasser T & Lucking CB. (2006). Parkin

- modulates gene expression in control and ceramide-treated PC12 cells. *Mol Biol Rep* **33**, 13-32.
- Vadlamudi RK, Joung I, Strominger JL & Shin J. (1996). p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* **271**, 20235-20237.
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, Gonzalez-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G & Wood NW. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* **304**, 1158-1160.
- van Groen T, Kadish I, Popovic N, Popovic M, Caballero-Bleda M, Bano-Otalora B, Vivanco P, Rol MA & Madrid JA. (2009). Age-related brain pathology in Octodon degu: Blood vessel, white matter and Alzheimer-like pathology. *Neurobiol Aging*.
- Vasto S, Candore G, Duro G, Lio D, Grimaldi MP & Caruso C. (2007). Alzheimer's disease and genetics of inflammation: a pharmacogenomic vision. *Pharmacogenomics* **8**, 1735-1745.
- Vasto S, Candore G, Listi F, Balistreri CR, Colonna-Romano G, Malavolta M, Lio D, Nuzzo D, Mocchegiani E, Di Bona D & Caruso C. (2008). Inflammation, genes and zinc in Alzheimer's disease. *Brain Res Rev* **58**, 96-105.
- Vilar R, Coelho H, Rodrigues E, Gama MJ, Rivera I, Taioli E & Lechner MC. (2007). Association of A313 G polymorphism (GSTP1*B) in the glutathione-S-transferase P1 gene with sporadic Parkinson's disease. *Eur J Neurol* **14**, 156-161.
- Von Coelln R, Thomas B, Savitt JM, Lim KL, Sasaki M, Hess EJ, Dawson VL & Dawson TM. (2004). Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10744-10749.
- Wakabayashi K, Engelender S, Yoshimoto M, Tsuji S, Ross CA & Takahashi H. (2000). Synphilin-1 is present in Lewy bodies in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **47**, 521-523.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ & Selkoe DJ. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* **416**, 535-539.
- Wang R, Sweeney D, Gandy SE & Sisodia SS. (1996). The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry. *J Biol Chem* **271**, 31894-31902.
- Wang Y, Martinez-Vicente M, Kruger U, Kaushik S, Wong E, Mandelkow EM, Cuervo AM & Mandelkow E. (2009). Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing. *Hum Mol Genet* **18**, 4153-4170.
- Ward CD, Duvoisin RC, Ince SE, Nutt JD, Eldridge R & Calne DB. (1983). Parkinson's disease in 65 pairs of twins and in a set of quadruplets. *Neurology* **33**, 815-824.
- Waring SC & Rosenberg RN. (2008). Genome-wide association studies in Alzheimer disease. *Arch Neurol* **65**, 329-334.
- Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN & Rubinsztein DC. (2003). Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *J Biol Chem* **278**, 25009-25013.
- Wegiel J, Kaczmarek W, Barua M, Kuchna I, Nowicki K, Wang KC, Yang S, Frackowiak J, Mazur-Kolecka B, Silverman WP, Reisberg B, Monteiro I, de Leon M, Wisniewski T, Dalton A, Lai F, Hwang YW, Adayev T, Liu F, Iqbal K, Iqbal IG & Gong CX. (2010). Link Between DYRK1A Overexpression and Several-Fold Enhancement of Neurofibrillary Degeneration With 3-Repeat Tau Protein in Down Syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol*.

- Wei H, Liang G, Yang H, Wang Q, Hawkins B, Madesh M, Wang S & Eckenhoff RG. (2008). The common inhalational anesthetic isoflurane induces apoptosis via activation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Anesthesiology* **108**, 251-260.
- Wei H & Xie Z. (2009). Anesthesia, calcium homeostasis and Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **6**, 30-35.
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY & Kirschner MW. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 1858-1862.
- Welch WJ & Brown CR. (1996). Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell Stress Chaperones* **1**, 109-115.
- West A, Farrer M, Petrucelli L, Cookson M, Lockhart P & Hardy J. (2001). Identification and characterization of the human parkin gene promoter. *J Neurochem* **78**, 1146-1152.
- West AB, Lockhart PJ, O'Farrell C & Farrer MJ. (2003). Identification of a novel gene linked to parkin via a bi-directional promoter. *J Mol Biol* **326**, 11-19.
- Wiggers. (1832). Untersuchung uber das mutterkorn, Secale cornutum. *Justus Liebigs Annln Chem* **1**, 129-182.
- Williams RS, Cheng L, Mudge AW & Harwood AJ. (2002). A common mechanism of action for three mood-stabilizing drugs. *Nature* **417**, 292-295.
- Wimo A, Winblad B, Engedal K, Soininen H, Verhey F, Waldemar G, Wetterholm AL, Mastey V, Haglund A, Zhang R, Miceli R, Chin W & Subbiah P. (2003). An economic evaluation of donepezil in mild to moderate Alzheimer's disease: results of a 1-year, double-blind, randomized trial. *Dement Geriatr Cogn Disord* **15**, 44-54.
- Winklhofer KF, Henn IH, Kay-Jackson PC, Heller U & Tatzelt J. (2003). Inactivation of parkin by oxidative stress and C-terminal truncations: a protective role of molecular chaperones. *J Biol Chem* **278**, 47199-47208.
- Wolkers WF, Walker NJ, Tablin F & Crowe JH. (2001). Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying. *Cryobiology* **42**, 79-87.
- Wong ES, Tan JM, Wang C, Zhang Z, Tay SP, Zaiden N, Ko HS, Dawson VL, Dawson TM & Lim KL. (2007). Relative Sensitivity of Parkin and Other Cysteine-containing Enzymes to Stress-induced Solubility Alterations. *J Biol Chem* **282**, 12310-12318.
- Xie Z, Culley DJ, Dong Y, Zhang G, Zhang B, Moir RD, Frosch MP, Crosby G & Tanzi RE. (2008). The common inhalation anesthetic isoflurane induces caspase activation and increases amyloid beta-protein level in vivo. *Ann Neurol* **64**, 618-627.
- Xie Z, Dong Y, Maeda U, Alfille P, Culley DJ, Crosby G & Tanzi RE. (2006a). The common inhalation anesthetic isoflurane induces apoptosis and increases amyloid beta protein levels. *Anesthesiology* **104**, 988-994.
- Xie Z, Dong Y, Maeda U, Moir R, Inouye SK, Culley DJ, Crosby G & Tanzi RE. (2006b). Isoflurane-induced apoptosis: a potential pathogenic link between delirium and dementia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **61**, 1300-1306.
- Xie Z, Dong Y, Maeda U, Moir RD, Xia W, Culley DJ, Crosby G & Tanzi RE. (2007). The inhalation anesthetic isoflurane induces a vicious cycle of apoptosis and amyloid beta-protein accumulation. *J Neurosci* **27**, 1247-1254.
- Xie Z & Tanzi RE. (2006). Alzheimer's disease and post-operative cognitive dysfunction. *Exp Gerontol* **41**, 346-359.
- Xu F, Zhang J, Recio-Pinto E & Blanck TJ. (2000). Halothane and isoflurane augment depolarization-induced cytosolic CA²⁺ transients and attenuate carbachol-stimulated CA²⁺ transients. *Anesthesiology* **92**, 1746-1756.
- Yamamoto S & Kazama JJ. (2007). [Mechanism of beta(2)-microglobulin-related amyloid fibril formation in CKD]. *Clin Calcium* **17**, 740-744.

- Yamamoto S, Wajima T, Hara Y, Nishida M & Mori Y. (2007). Transient receptor potential channels in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* **1772**, 958-967.
- Yan P, Hu X, Song H, Yin K, Bateman RJ, Cirrito JR, Xiao Q, Hsu FF, Turk JW, Xu J, Hsu CY, Holtzman DM & Lee JM. (2006). Matrix metalloproteinase-9 degrades amyloid-beta fibrils in vitro and compact plaques in situ. *J Biol Chem* **281**, 24566-24574.
- Yang YX, Muqit MM & Latchman DS. (2006). Induction of parkin expression in the presence of oxidative stress. *Eur J Neurosci* **24**, 1366-1372.
- Yasojima K, Schwab C, McGeer EG & McGeer PL. (1999). Up-regulated production and activation of the complement system in Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol* **154**, 927-936.
- Yasushi Nishizaki CY, Yasuhiro Toshimori, Norie Arai, Sachiko Akamatsu, Toshiharu Hanaya, Shigeyuki Arai, Masao Ikeda and Masashi Kurimoto (2000). Disaccharide-trehalose inhibits bone resorption in ovariectomized mice. *Nutrition Research* **20**, 653-664.
- Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atares B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Munoz DG & de Yébenes JG. (2004). The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* **55**, 164-173.
- Zawia NH, Lahiri DK & Cardozo-Pelaez F. (2009). Epigenetics, oxidative stress, and Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* **46**, 1241-1249.
- Zempel H, Thies E, Mandelkow E & Mandelkow EM. (2010). Abeta oligomers cause localized Ca(2+) elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. *J Neurosci* **30**, 11938-11950.
- Zeng X, Overmeyer JH & Maltese WA. (2006). Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. *J Cell Sci* **119**, 259-270.
- Zhang B, Dong Y, Zhang G, Moir RD, Xia W, Yue Y, Tian M, Culley DJ, Crosby G, Tanzi RE & Xie Z. (2008a). The inhalation anesthetic desflurane induces caspase activation and increases amyloid beta-protein levels under hypoxic conditions. *J Biol Chem* **283**, 11866-11875.
- Zhang G, Dong Y, Zhang B, Ichinose F, Wu X, Culley DJ, Crosby G, Tanzi RE & Xie Z. (2008b). Isoflurane-induced caspase-3 activation is dependent on cytosolic calcium and can be attenuated by memantine. *J Neurosci* **28**, 4551-4560.
- Zhang L, Yu J, Pan H, Hu P, Hao Y, Cai W, Zhu H, Yu AD, Xie X, Ma D & Yuan J. (2007). Small molecule regulators of autophagy identified by an image-based high-throughput screen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19023-19028.
- Zhang XP & List WF. (1996). Effects of halothane, isoflurane and sevoflurane on calcium-related contraction in porcine coronary arteries. *Acta Anaesthesiol Scand* **40**, 815-819.
- Zhang Y, Gao J, Chung KK, Huang H, Dawson VL & Dawson TM. (2000). Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13354-13359.
- Zhen Y, Dong Y, Wu X, Xu Z, Lu Y, Zhang Y, Norton D, Tian M, Li S & Xie Z. (2009). Nitrous oxide plus isoflurane induces apoptosis and increases beta-amyloid protein levels. *Anesthesiology* **111**, 741-752.
- Zhou W, Zhu M, Wilson MA, Petsko GA & Fink AL. (2006). The oxidation state of DJ-1 regulates its chaperone activity toward alpha-synuclein. *J Mol Biol* **356**, 1036-1048.

El diario "El País" del sábado 13 de marzo 2010, en relación con el tema de la muerte de Miguel Delibes (12 de marzo de 2010), reproduce el siguiente párrafo autográfico del escritor:

"El escritor Miguel Delibes murió el 21 de mayo de 1998 en una mesa de operaciones de la clínica de la Luz. Esto es, los últimos años no le han servido de nada. El balance de la intervención quirúrgica fue desfavorable. Perdí de todo: perdí hematíes, perdí memoria, perdí concentración... En el quirófano entró un hombre inteligente y salió un lerdo. Imposible volver a escribir. Lo noté enseguida. No era capaz de ordenar mi cerebro. La memoria me fallaba y me faltaba capacidad para concentrarme. ¿Cómo abordar una novela y mantener vivos en mi imaginación, durante dos o tres años, personajes con su vida propia y sus propias características? ¿Cómo profundizar en las ideas exigidas por un encargo de mediana entidad? Estaba acabado".

VIII- ANEXO II

ARTICULOS EN LOS QUE HA PARTICIPADO DURANTE EL PERIODO DE TESIS DOCTORAL:

- Rodríguez-Navarro JA, Gómez A, Rodal I, **Perucho J**, Martínez A, Furió V, Ampuero I, Casarejos MJ, Solano RM, de Yébenes JG, Mena MA. *Parkin deletion causes cerebral and systemic amyloidosis in human mutated tau over-expressing mice*. Hum Mol Genet. 2008 Oct 15;17(20):3128-43. Epub 2008 Jul 17. PMID: 18640988. (IP: 8.099).
- Rodríguez-Navarro JA, Solano RM, Casarejos MJ, Gomez A, **Perucho J**, de Yébenes JG, Mena MA. *Gender differences and estrogen effects in parkin null mice*. J Neurochem. 2008 Sep;106(5):2143-57. Epub 2008 Jul 15. PMID: 18643794 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Rubio I, Rodríguez-Navarro JA, Tomás-Zapico C, Ruíz C, Casarejos MJ, **Perucho J**, Gómez A, Rodal I, Lucas JJ, Mena MA, de Yébenes JG. *Effects of partial suppression of parkin on huntingtin mutant R6/1 mice*. Brain Res. 2009 Jul 24;1281:91-100. Epub 2009 May 21. PMID: 19464273. (IP: 2.218).
- Casarejos MJ, Solano RM, Rodriguez-Navarro JA, Gómez A, **Perucho J**, Castaño JG, García de Yébenes J, Mena MA. *Parkin deficiency increases the resistance of midbrain neurons and glia to mild proteasome inhibition: the role of autophagy and glutathione homeostasis*. J Neurochem. 2009 Sep;110(5):1523-37. Epub 2009 Jun 22. PMID: 19549073. (IP: 4.45).
- **Perucho J**, Casarejos MJ, Rubio I, Rodriguez-Navarro JA, Gómez A, Ampuero I, Rodal I, Solano RM, Carro E, García de Yébenes J, Mena MA. *The effects of parkin suppression on the behaviour, amyloid processing, and cell survival in APP mutant transgenic mice*. Exp Neurol. 2010 Jan;221(1):54-67. Epub 2009 Oct 6. PMID: 19815012. (IP: 3.974).
- **Perucho J**, Rubio I, Casarejos MJ, Gomez A, Rodriguez-Navarro JA, Solano RM, De Yébenes JG, Mena MA. *Anesthesia with Isoflurane Increases Amyloid Pathology in Mice Models of Alzheimer'S Disease*. J Alzheimers Dis. [Epub ahead of print] PMID: 20009213. (IP: 4.18).
- **Perucho J**, Rubio I, Casarejos MJ, Gomez A, Rodriguez-Navarro JA, Solano RM, De Yébenes JG, Mena MA. J Alzheimers Dis. 2010 Jan 7. [Epub ahead of print] No abstract available. PMID: 20061615 [PubMed - as supplied by publisher]. Response in J Alzheimer Dis. (IP: 4.18).
- Rodriguez-Navarro JA, Rodriguez-Alonso L, Casarejos MJ, Solano RM, Gomez A, **Perucho J**, Cuervo AM, García de Yébenes J, Mena MA. *Trehalose ameliorates dopaminergic and tau pathology in parkin deleted/tau over-expressing mice through autophagy activation*. Neurobiology Disease 39: 423-438. (IP 4.852).
- María Ángeles Mena, **Juan Perucho**, and Justo Garcia de Yébenes (2010) *Studies in animal models of the effects of anesthetics on behavior, biochemistry and neuronal cell death*. J Alzheimer Disease, sept 21 2010. (IP: 5.101).
- M.J. Casarejos, R.M. Solano, A. Gómez, **J. Perucho**, J.G. de Yébenes and M.A. Mena. *The accumulation of neurotoxic proteins, induced by proteasome*

inhibition, is reverted by trehalose, an enhancer of autophagy, in human neuroblastoma cells. Neurochemistry International, 2010 (en prensa) (IP: 3.541).

Human Molecular Genetics, 2008, Vol. 17, No. 20 3128–3143
doi:10.1093/hmg/ddn210
Advance Access published on July 17, 2008

Parkin deletion causes cerebral and systemic amyloidosis in human mutated tau over-expressing mice

José A. Rodríguez-Navarro¹, Ana Gómez¹, Izaskun Roda¹, Juan Peruchio¹, Armando Martínez², Vicente Furló², Israel Ampuero⁴, María J. Casarejos¹, Rosa M. Solano¹, Justo García de Yébenes² and María A. Mena^{1,*}

¹Department of Neurobiology and ²Department of Neurology, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain, ³Department of Pathology, Hospital Universitario San Carlos, Madrid, Spain and ⁴Banco de tejidos para Investigaciones Neurológicas and CIBERNED, Madrid, Spain

Received May 7, 2008; Revised and Accepted July 16, 2008

Deposition of proteins leading to amyloid takes place in some neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Huntington's disease. Mutations of tau and parkin proteins produce neurofibrillary abnormalities without deposition of amyloid. Here we report that mature, parkin null, over-expressing human mutated tau ($PK^{-/-}/Tau^{VLW}$) mice have altered behaviour and dopamine neurotransmission, tau pathology in brain and amyloid deposition in brain and peripheral organs. $PK^{-/-}/Tau^{VLW}$ mice have abnormal behaviour and severe drop out of dopamine neurons in the ventral midbrain, up to 70%, at 12 months and abundant phosphorylated tau positive neuritic plaques, neurofibrillary tangles, astrogliosis, microgliosis and plaques of murine β -amyloid in the hippocampus. $PK^{-/-}/Tau^{VLW}$ mice have organomegaly of the liver, spleen and kidneys. The electron microscopy of the liver confirmed the presence of a fibrillary protein deposits with amyloid characteristics. There is also accumulation of mouse tau in hepatocytes. These mice have lower levels of CHIP-HSP70, involved in the proteasomal degradation of tau, increased oxidative stress, measured as depletion of glutathione which, added to lack of parkin, could trigger tau accumulation and amyloidogenesis. This model is the first that demonstrates β -amyloid deposits caused by over-expression of tau and without modification of the amyloid precursor protein, presenilins or secretases. $PK^{-/-}/Tau^{VLW}$ mice provide a link between the two proteins more important for the pathogenesis of Alzheimer disease.

INTRODUCTION

Several sporadic and familial neurodegenerative diseases [Alzheimer's disease (AD), fronto-temporal dementia (FTD), progressive supranuclear palsy (PSP), corticobasal degeneration (CBD) etc.] present abnormal tau function and pathological deposits of this protein in the human brain. Tau is a protein which stabilizes microtubules and plays a critical role in the neuronal transport system. Most tauopathies have unknown origin and pathogenesis, and they are considered related to posttranslational alterations of tau (1). The familial tauopathies, described in several hundred families around the world, are related to more than 30 different mutations of the

Tau gene, located in chromosome 17. They are clinically characterized by a variable combination of parkinsonism and dementia (2).

The most important sporadic tauopathy in humans is AD, a degenerative dementia characterized pathologically by the extracellular deposition of amyloid and intracellular accumulation of neuro-fibrillary tangles, which are immunoreactive to tau (3). The link between tau and β -amyloid peptide is unknown.

Parkinson's disease (PD) is a disorder of multifactorial aetiology (4). From 10 to 25% of cases present familial aggregation and in the last few years more than 10 genes or loci have been found to be associated with familial parkinsonism

*To whom correspondence should be addressed at: Departamento de Investigación, Hospital Ramón y Cajal, Ctra. de Colmenar, Km. 9, Madrid 28034, Spain. Tel: +34 913366384; Fax: +34 913369016; Email: maria.mena@hrc.es

Gender differences and estrogen effects in parkin null mice

José A. Rodríguez-Navarro,* Rosa M. Solano,* María J. Casarejos,* Ana Gómez,*
Juan Perucho,* Justo García de Yébenes† and María A. Mena*

*Department of Neurobiology, Hospital "Ramón y Cajal" and CIBERNED, Madrid, Spain

†Department of Neurology, Hospital "Ramón y Cajal" and CIBERNED, Madrid, Spain

Abstract

Estrogens are considered neuroprotective for dopamine neurons. Parkinson's disease is more frequent in males than in females, and more prevalent in females with short reproductive life. Estrogens are neuroprotective against neurotoxic agents for dopamine neurons *in vivo* and *in vitro*. Here, we have investigated the role of estrogens in wild-type (WT) and parkin null mice (PK-/-). WT mice present sexual dimorphism in neuroprotective mechanisms (Bcl-2/Bax, chaperones, and GSH), but some of these intersex differences disappear in PK-/- . Tyrosine hydroxylase (TH) protein and TH+ cells decreased earlier and more severely in female than in male PK-/- mice. Neuronal cultures from midbrain of WT and PK-/- mice were treated with estradiol from 10 min to 48 h. Short-term treatments activated the mitogen-activated protein kinase pathway of WT and PK-/- neurons and the phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT/glycogen synthase kinase-3 pathway of WT but not of PK-/- cultures. Long-term treat-

ments with estradiol increased the number of TH+ neurons, the TH expression, and the extension of neurites, and decreased the level of apoptosis, the expression of glial fibrillary acidic protein, and the number of microglial cells in WT but not in PK-/- cultures. The levels of estrogen receptors were elevated in midbrain cultures and in the striatum of adult PK-/- male mice, suggesting that suppression of parkin changes the estrogen receptors turnover. From our data, it appears that parkin participates in the cellular estrogen response which could be of interest in the management of parkin-related Parkinson's disease patients.

Keywords: C-terminal Hsc-interacting protein, dopamine neurons, estradiol, estrogen receptors, glial cells, heat-shock protein 70, mitogen-activated protein kinase, Park-2 gene, Parkinson's disease and gender differences, phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT/glycogen synthase kinase-3.

J. Neurochem. (2008) 106, 2142–2147

Estrogens have neurotrophic effects on midbrain dopamine (DA) neurons, promoting the growth of tyrosine hydroxylase-positive (TH+) neurites, increasing the TH expression in the geriatric mouse midbrain and enhancing differentiation and survival of dopaminergic neurons derived from human neonatal stem cells (Rivest *et al.* 1987; Beyer and Kandel 2000; Sawada and Shirohama 2000; Ivánova and Beyer 2003; Kishi *et al.* 2005). In addition, *in vitro* and *in vivo* models of Parkinson's disease (PD), estrogens protect DA cells from toxic compounds such as MPTP (DiMarchi and Dixon 1997; Callier *et al.* 2000; Balme *et al.* 2007), meta-amphetamine (Gajjar *et al.* 2005), and 6-OH-DA (Dixon 1997). Estrogen-mediated neuroprotective effects may have clinical relevance in PD, as the disease occurs 1.5 times more frequently in men than in women (Fahn and Sulzer 2004; Wooten *et al.* 2004; Haaxma *et al.* 2007), and in women, the age at onset of PD correlates with the duration of the fertile life (Ruggone *et al.* 2006; Rocca *et al.* 2008).

Cellular responses to estrogen are tightly controlled. A large number of estrogen receptor (ER) interacting proteins, which behave as co-activators or co-repressors, modify the ER's transcriptional activity (Mettivier *et al.* 2003; Reid *et al.*

Received March 14, 2008; revised manuscript received June 18, 2008; accepted July 8, 2008.

Address correspondence and reprint requests to Dr M. A. Mena, Departamento de Neurobiología, Hospital Ramón y Cajal, Ctra. de Colmenar, Km 9, Madrid 28034, Spain. E-mail: maria.mena@hrcajal.com

Abbreviations used: AKT, serine/threonine kinase protein; BCL2, B-cell lymphoma 2; ER, estrogen receptor; ERα, estrogen receptor-α; ERβ, estrogen receptor-β; GSH, glutathione; GSK-3, glycogen synthase kinase-3; HSP, heat-shock protein; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MPTP, 1-methyl-4-phenylpyridinium; PD, Parkinson's disease; PI3K, phosphatidylinositol 3'-kinase; PK-/-, parkin null mice; R-NC, ratylin-1; ERα, estrogen receptor-α; ERβ, estrogen receptor-β; TH, tyrosine hydroxylase; WT, wild-type.

Effects of partial suppression of parkin on huntingtin mutant R6/1 mice.

Isabel Rubio, PhD,^{1,2} José Antonio Rodríguez-Navarro, PhD,² Cristina Tomás, PhD,⁴ Carolina Ruiz, PhD,¹ María José Casarejos, PhD,² Juan Peruchio, PhD,^{1,2} Ana Gómez, MS,² Izaskun Rodal, MS,¹ José Javier Lucas, PhD,⁴ María Angeles Mena, PhD,² and Justo García de Yébenes, PhD, MD¹

¹Servicio de Neurología; ²CIBERNED; ³Laboratorio de Neurofarmacología, Hospital Ramón y Cajal; ⁴Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain.

Correspondence:

Justo García de Yébenes

Servicio de Neurología; Hospital Ramón y Cajal; Ctra. Colemenar, Km 9,1
Madrid 28034, Spain

Phone: 34-91-3368821; Fax: 34-91-3369016

e-mail: jgyeben@ yahoo.com

Running head: huntingtin & parkin

Title: 73;

Running head: 19;

Abstract: 230;

Manuscript: 2827;

Nº of figures: 8.

Nº of color figures: 2;

Nº of references: 37

Conflicts of interest: None declared.

Maria J. Casarejos,^{*,†} Rosa M. Solano,^{*,†} José A. Rodríguez-Navarro,^{*} Ana Gómez,^{*} Juan Peruchó,^{*} Jose G. Castaño,[†] Justo García de Yébenes[‡] and María A. Mena^{*}

Department of Neurology, Hospital Ramón y Cajal, CIBERNEURO, Madrid, Spain

Parkin mutations in humans produce parkinsonism whose pathogenesis is related to impaired protein degradation, increased free radicals and abnormal neurotransmitter release. In this study, we have investigated whether partial proteasomal inhibition by epoxomicin, an ubiquitin proteasomal system (UPS) irreversible inhibitor, further aggravates the cellular effects of parkin suppression in midbrain neurons and glia. We observed that parkin null (PK-KO) midbrain neuronal cultures are resistant to epoxomicin-induced cell death. This resistance is due to increased Bcl-2 and Bcl-xL protein levels in PK-KO mice. The treatment with epoxomicin increases, in wild type (WT) cultures, the pro-apoptotic Bax/Bcl-2 ratio, the phosphorylation of I κ B, and the levels of chaperones heat-shock protein 70 and C-terminal Hsc-70-interacting protein, but none of these effects took place in epoxomicin-treated PK-KO cultures. Poly-ubiquitinated proteins increased more in WT than in PK-KO-treated neuronal cultures. Parkin accumulated in WT neuronal cultures treated with epoxomicin. Markers of autophagy, such as LC3BII, were increased in naïve PK-KO cultures, and further increased after treatment with epoxomicin, implying that the blockade of the proteasome in PK-KO

Keywords: autophagy-lysosomal pathway, chaperones, DJ-1, dopamine neurons, glial cells, Parkinson's disease.
J. Neurochem. (2009) 110, 1520–1537.

Address correspondence and reprint requests to Dr María A. Mota, Department of Neurobiology/Investigación, Hospital Ramón y Cajal, Ctra de Colmenar, Km. 9, Madrid 28034, Spain.
E-mail: maria.a.mota@irca.es

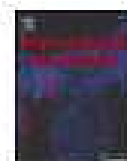
^bThese authors contributed equally to the article.

Abbreviations used: AET, adenosine kinase protein; AMC, Pantoic- α -methylsuccinate; BSA, bovine serum albumin; DMSO, *D*-dimethylsulfoxide; Cdk2, C-terminal Kinase-inhibiting protein; DA, dopamine; DIV, days *in vitro*; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FCS, fetal calf serum; HSP70, heat-shock protein 70; PBS, phosphate-buffered saline; PKA, protein kinase A; PK-C δ , parvalbumin-DK67, phosphorylmyosin phosphatase; RDX, recombinant dodecyl sulfate UPR, ubiquitin proteasomal system; WT, wild type.

THE NEW YORK PUBLIC LIBRARY

Journal Compilation © 2009 International Society for Neuroendocrinology. J. Neuroendocrinol. (2009) 118, 1513–1517

1574



The effects of parkin suppression on the behaviour, amyloid processing, and cell survival in APP mutant transgenic mice

Juan Perucho^a, María J. Casarejos^a, Isabel Rubio^b, José A. Rodríguez-Navarro^a, Ana Gómez^a, Israel Ampuero^c, Izaskun Rodal^b, Rosa M. Solano^a, Eva Carro^d, Justo García de Yébenes^c, María A. Mena^{a,*}

^a Department of Neurology, Hospital "Ramón y Cajal", Madrid, Spain

^b Department of Neurology, Hospital "Ramón y Cajal", Madrid, Spain

^c Centro de Estudios para Investigaciones Neurológicas, Madrid, Spain

^d Department of Neurology, Hospital "12 de Octubre", Madrid, Spain and ^{1st} CIBERAG, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 May 2008

Revised 11 August 2008

Accepted 29 September 2008

Available online 6 October 2008

Keywords:

Alzheimer's disease

Autophagy

β -Amyloid

IQG proteins

Cognitive deficits

Superoxide

Parkin

Tau

UPS

ABSTRACT

Parkin suppression induces accumulation of β -amyloid in mutant tau mice. We studied the effect of parkin suppression on behaviour and brain pathology in APP_{wt} mutant mice. We produced double mutant mice with human mutated APP_{wt}+partial (hemiagout) or total (homologous) deletion of Park-2 gene. We studied the development, behaviour, brain histology, and biochemistry of 12- and 18-month-old animals in 8 groups of mice, with identical genetic background: wild-type (WT), APP_{wt} overexpressing (APP), hemizygous acid homologous deletion of Park-2 (PK^{+/−} and PK^{−/−}, respectively), and double mutants (APP/PK^{+/−} and APP/PK^{−/−}).

APP mice have reduced weight gain, decreased motor activity, and reduced number of astrocytes and of amyloid plaques in the Y-maze, abnormalities which were partially or completely normalized in APP/PK^{+/−} and APP/PK^{−/−} mice. The double mutants had similar number of mutant human APP transgene copies than the APP and level of 40 and 80 kDa prothymosin, but both of them, APP/PK^{+/−} and APP/PK^{−/−} mice, had less plaques in cortex and hippocampus than the APP mice. APP mutant mice had increased apoptosis, proapoptotic Bax, Bcl2 mRNA, and gliosis, but these death-promoting factors were normalized in APP/PK^{+/−} and APP/PK^{−/−} mice. APP mutant mice had an increased number of tau immunoreactive neuritic plaques in the cerebral cortex as well as increased level of total and phosphorylated tau protein, and these changes were partially normalized in APP/PK^{+/−} hemizygous and homologous APP/PK^{+/−} mice. Compensatory protein-degrading systems such as IGF1R, GHR, and macroautophagy were increased in APP/PK^{+/−} and APP/PK^{−/−}. Furthermore, the dynactin-1- and dynactin-2-proteinase activities decreased in APP mice in comparison with WT, were normalized in the APP/PK^{+/−} mice.

We proposed that partial and total suppression of parkin triggers compensatory mechanisms, such as dopamine overproduction and increased autophagy, which improved the behavioural and cellular phenotype of APP_{wt} mice.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Alzheimer's disease (AD), the most prevalent and socio-economically costing neurodegenerative disorder in the developed world, is a cognitive disorder related to abnormal deposition of mainly two proteins, β -amyloid and tau (Glenner and Wang, 1984; Grundke-Iqbal

et al., 1988). Deposits of β -amyloid are extracellular and form the classical amyloid plaques. The pathogenic role of β -amyloid deposits is unclear and most workers consider that cell damage is mainly related to soluble β -amyloid and other proteins (Hung et al., 2008; Kaye et al., 2009; Lord et al., 2008; Oddo et al., 2004; Walsh et al., 2002). There is, therefore, a great interest in the mechanisms which control the processing of β -amyloid peptides since the manipulation of these mechanisms could open new therapies for AD.

Abnormal processing of β -amyloid, and eventually its deposition, in AD could be related to several mechanisms including excessive production, alteration of the sequence, abnormalities of transport, alteration of chaperoning or proteosomal processing, and deficits in its degradation through the lysosome or the proteasome system (UPS) (Almeida et al., 2008; Han et al., 2008; Oddo et al., 2008). Parkin is a protein with ubiquitin ligase E3 function, whose deletions

Abbreviations: A β , β -amyloid peptide; AD, Alzheimer's disease; APP, amyloid precursor protein; APP_{wt}, APP with wild-type sequence; GHR, growth hormone releasing protein; IQG, tau microtubule-associated protein 1 light chain 3; PK, Parkin's disease; PK^{+/−}, parkin null mice; APP, hemizygous deletion; PK^{−/−}, homozygous deletion; TH, thymosin α -proteinase; RAS, poly (ADP-ribose) polymerase; UPS, ubiquitin-proteasome system; WT, wild-type.

* Corresponding author. Centro Neurobiología-Investigación, Hospital Ramón y Cajal, Ctra. de Colmenar, km. 5, Madrid 28034, Spain. Fax: +34 91 386 90 16.

E-mail address: maria.mena@rcaj.es (M.A. Mena).

0014-4886/\$ – see front matter © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.exnr.2008.09.018

Anesthesia with Isoflurane Increases Amyloid Pathology in Mice Models of Alzheimer's Disease

Juan Peruchio^A, Isabel Rubio^B, María J. Casarejón^A, Ana Gómez^A, José A. Rodríguez-Navarro^A, Rosa M. Solano^A, Jesús García De Yébenes^{B,*} and María A. Mena^B

^ADepartment of Neurobiology, CIBERNED, Madrid, Spain

^BNeurology, Hospital "Ramón y Cajal", CIBERNED, Madrid, Spain

Received 26 October 2016

Abstract. There is a great interest in the environmental and genetic factors which modify the risk of Alzheimer's disease since the manipulation of these factors could help to change the prevalence and natural course of the disease. Among the first group, anesthesia and surgery have been considered as risk enhancers, based mostly on 'in vivo' experiments and epidemiological studies. We have investigated the effects of repetitive anesthesia, twice a week, for 3 months, from 7 to 10 months of age, with isoflurane on survival, behavior, apoptosis in hippocampal cells, amyloid- β (A β) peptide and its precursor, chaperones and autophagy in WT and A β PP_{sw} mice. We have found that A β PP_{sw} mice treated with isoflurane have increased mortality, less responsiveness after anesthesia, long lasting reduced exploratory behavior, increased number of TUNEL⁺ apoptotic cells, and increased ratio of pro-apoptotic proteins in hippocampus, reduced astroglial and increased microglial responses, increased A β aggregates and high molecular weight peptides, attenuated chaperone responses and reduced autophagy. These effects were not present in WT mice, suggesting that the deleterious impact of isoflurane on behavior, survival, neuronal cell death, and processing of proteins involved in neurodegeneration is restricted to subjects with increased susceptibility but does not affect normal subjects.

Keywords: A β PP_{sw} mice, amyloid pathology, apoptotic cell death, autophagy, chaperones, cognitive deficits, glial cells, isoflurane

Supplementary data available at <http://www.wj-onlinelibrary.com/doi/10.3233/JAD-180106/supplementarydata1>

INTRODUCTION

The cause of Alzheimer's disease (AD) is unknown in most patients, but it is considered that both genetic and environmental factors modify the risk of this disease [1–4]. Among the latter, several epidemiological studies have suggested that anesthesia and some surgical procedures may increase the risk of AD. Hansen and colleagues [5] found that a cumulative exposure to general and spinal anesthesia before the age of 50

was inversely correlated with age at onset in patients with AD. Other studies yielded controversial results [6, 7]. This controversy may be related to the fact that many human studies of the risk of AD with anesthetics were unpowered or confounded by co-morbidities. But the issue is so important that a first international symposium on anesthesia and AD was recently organized [8].

Postoperative cognitive decline (POCD) is well described [9–14] in humans and its risk factors may overlap with those of AD. There is growing concern that inhaled anesthetics might affect patient cognitive abilities beyond the postoperative period, producing persistent deficits in some aged patients.

*Correspondence to: Dr. J. García De Yébenes, Department of Neurology, Hospital Ramón y Cajal, Ctra. de Colmenar, Km. 9, Madrid 28054, Spain. Tel.: +34 91 336 88 88; Fax: +34 91 336 90 90; E-mail: jgyeben@rycj.es

Jose A. Rodríguez-Navarro^a, Laura Rodríguez^a, María J. Casarejos^a, Rosa M. Solano^a, Ana Gómez^a, Juan Peruchó^a, Ana María Cuervo^c, Justo García de Yébenes^b, María A. Mena^{a,b}

^a Department of Neurobiology, Harvard Medical School, and Harvard Medical School, Boston.^b Determined as a percentage of natural gas. ^c Based on 100% of natural gas. ^d Based on 100% of natural gas.

² Department of Cell, Developmental and Molecular Biology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115, USA

ARTICLE INFO

Article History
 Received 13 February 2010
 Revised 26 April 2010
 Accepted 11 May 2010
 Available online 28 May 2010

- *Hydrocotyle*
- *Achillea*
- *Parthenocissus*
- *Taxus canadensis*
- *Asplenium*
- *Polygonum*
- *Taxus*
- *Wormwood*

ABSTRACT

Tauopathies are neurodegenerative disorders, sporadic or familial, mainly characterized by dementia and parkinsonism associated to aopathy of the frontotemporal cortex and the basal ganglia, with deposition of abnormal tau in brain. Hereditary tauopathies are related with mutations of the tau gene. Up to the present, these diseases have not been helped by any disease-modifying treatment, and patients die a few years after the onset of symptoms.

We have developed and characterized a mouse model of tauopathy with Parkinson, overexpressing human mutated tau protein with deletion of part of τ in $\tau^{M18} \Delta$ (τ^{M18}). At 2 months of age, these mice present abnormal dopamine-related behavior, widespread loss of dopamine neurons in the ventral midbrain, reduced dopamine levels in the striatum, and abundant phosphorylated tau-positive neurotic plaques, neurofibrillary tangles, axonal spherules, and, at 12 months old, clusters of mature α -synuclein in the hippocampus.

larger, astroglial, and 1- to 2-month-old, pupate or murine β -amyloid in the hippocampus. Chelation is a natural biochemical technique for removal of abnormal proteins through enhancement of autophagy. In this work, we tested if 15 chelation in the drinking water reverts the $\text{P}30^{\text{APP}}/\text{Tau}^{\text{M18}}/\text{Ran}^{\text{Ran}}$ phenotype. The treatment with chelation of 1-month-old $\text{P}30^{\text{APP}}/\text{Tau}^{\text{M18}}/\text{Ran}^{\text{Ran}}$ mice for 2.5 months reversed the deposits of dopamine neurons, which takes place in the ventral midbrain of vehicle-treated $\text{P}30^{\text{APP}}/\text{Tau}^{\text{M18}}/\text{Ran}^{\text{Ran}}$ and its reduced dopamine-related protein levels in the midbrain and striatum. The number of phosphorylated tau-positive neuritic plaques and the levels of phosphorylated tau decreased, as well as astrocytes in brain regions. The autophagy markers in the brain, the autophagic vacuoles isolated from the liver, and the electron microscopy data indicate that these effects of chelation are mediated by autophagy. The treatment with chelation for 4 months of 3-month-old $\text{P}30^{\text{APP}}/\text{Tau}^{\text{M18}}/\text{Ran}^{\text{Ran}}$ mice maintained the amelioration of the tau pathology and astrocytes but failed to revert GFAP-related pathology in the striatum. Furthermore, the 2-week treatment with chelation of 14-month-old $\text{P}30^{\text{APP}}/\text{Tau}^{\text{M18}}/\text{Ran}^{\text{Ran}}$ mice, at the limit of their life expectancy, improved the motor behavior and anatomy of these animals, and reduced their levels of phosphorylated tau and the number of murine GFAP-related plaques.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Key words: *Chlamydia trachomatis*; *Neisseria meningitidis*; *Neisseria gonorrhoeae*; *Haemophilus influenzae*; *Streptococcus pneumoniae*

Trehalose is a nonreducing disaccharide found in organisms from bacteria to plants, including yeast, fungi, and invertebrates. It protects the integrity of cells against various stresses (like heat, dehydration, cold, desiccation, and oxidation) by preventing protein denaturation (Chen and Haddad, 2004), and it is the sugar in the hemolymph of invertebrates. The majority of the protective properties of trehalose were discovered in yeast (Kandror et al., 2004); however, it also has beneficial effects in mammals because it is not endogenous (i.e., synthesized). In instance, it may be a valuable tool in cryopreservation of cells (Chen and Haddad, 2004; Wiklund et al., 2001). Many human food sources may contain substantial quantities of trehalose and no dose-dependent

[illegible]

* Corresponding author, Department of Neurology, Hospital General y de la Cruz de Cochran, km. 8, Carretera Interamericana, San José, Costa Rica. Tel. 2222 5511 x 14.

is available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

Review

Studies in Animal Models of the Effects of Anesthetics on Behavior, Biochemistry, and Neuronal Cell Death

María Ángeles Mena^a, Juan Peruchio^a, Isabel Rubio^b and Juan Carlos de Yébenes^{b,*}

^aDepartment of Neurobiology, Hospital Ramón y Cajal, and CIBERhd, Madrid, Spain

^bDepartment of Neurology, Hospital Ramón y Cajal, and CIBERhd, Madrid, Spain

Accepted 24 June 2010

Abstract. Recent clinical studies have suggested that there is an increased risk of Alzheimer's disease (AD) in patients undergoing surgical interventions, but it is unknown whether this effect is related to anesthesia, cardiovascular complications of surgery, or associated conditions such as hypoxemia. In addition, many patients, especially the elderly, present persistent post-operative cognitive deterioration after anesthesia, without clear complications during surgery. Experimental studies in animals may be helpful to dissect the pathogenic role of the different factors involved in surgery. Here, we review studies on the effects of anesthesia on neuronal function performed in tissue culture and in experimental animals. Several studies have shown that a small induction of anesthesia induces activation of caspase and cell death in glioma and pheochromocytoma cells in culture, which is prevented by treatment with the metal chelating agent ethylenediamine. Exposure of old rodents to anesthesia produced memory deficits and increased levels of amyloid- β (A β) peptide and phosphorylated tau in brain. The effects of long-term or short-term repetitive exposure to small molecular weight anesthetics are more severe in transgenic A β 7 mice than in wild type mice. In the former, the molecular weight decreased the number of TUNEL⁺ apoptotic cells and the ratio of pre-apoptotic proteins in hippocampus, reduced astroglial and increased microglial responses, decreased A β aggregates and high molecular weight peptides, abnormal chaperone response and reduced autophagy. In conclusion, anesthetic gases induce changes which may reproduce AD pathology in mice with mutations which produced AD. It would be interesting to know whether anesthetics are risky for subjects with special genetic risk factors.

Keywords: Alzheimer's disease, amyloid pathology, A β 7⁺ mice, apoptotic cell death, autophagy, cognitive deficits, chaperones, glial cells, ischemia, post-operative cognitive dysfunction, preanesthetics

INTRODUCTION

There is a great interest in the effects of anesthesia in the brain. While it is evident that anesthetics have been used widely in billions of surgical interventions performed in many patients in the last two centuries,

there is a debate concerning the role of anesthesia and surgery as enhancing risk factors for cognitive deterioration in patients with or at risk of Alzheimer's disease (AD) [1,2]. Some *in vitro* and in animal model studies provided support for this idea [3,4]. Several studies have found an increased prevalence of AD in subjects with a large number of surgical procedures under general anesthesia [5,6]. The causative relationship between surgical procedures under general anesthesia and the risk of AD, and the effects of these procedures on the brain, are complex since many different factors may

*Correspondence to: Dr. J. Carlos de Yébenes, Department of Neurology, Hospital Ramón y Cajal, Ctra. de Colmenar, Km. 9, Madrid 28014, Spain. Tel.: +34 91 336 88 33; Fax: +34 91 336 90 16; E-mail: jgyeben@quiron.es



The accumulation of neurotoxic proteins, induced by proteasome inhibition, is reverted by trehalose, an enhancer of autophagy, in human neuroblastoma cells

M.J. Casarejos^a, R.M. Solano^a, A. Gómez^a, J. Peruchó^a, J.C. de Yébenes^b, M.A. Mena^{a,*}

^a Departamento de Neurología y Neurocirugía, CIBERing, Hospital Ramón y Cajal, Complejo de Ciencias de la Salud, Madrid 28002, Spain

^b Departamento de Neurología, CIBERing, Hospital Ramón y Cajal, Madrid 28002, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 October 2010

Received in revised form 28 December 2010

Accepted 4 January 2011

Available online xxx

Keywords:

α -Synuclein

Tau

Autophagy–lysosomal pathway

Chaperones

U2–1

Glutathione

p-Tau

Proteasome activity

Parkinson's disease

Ubiquitination

ABSTRACT

Neurodegenerative diseases like Parkinson's disease, Alzheimer's disease, Huntington's disease and others are due to accumulation of abnormal proteins which fold improperly and impair neuronal function. Accumulation of these proteins could be achieved by several mechanisms including mutation, overproduction or impairment of its degradation. Inhibition of the normal protein degradation is produced by blockade of the ubiquitin–proteasome system. We have shown that epoxomicin, a proteasome inhibitor, increases the levels of proteins involved in neurodegenerative disorders such as α -synuclein and hyperphosphorylated tau in H1975 human neuroblastoma cells and that such increase promotes with an enhanced rate of cell death. We then investigated whether the stimulation of autophagy, an alternative mechanism for elimination of abnormal proteins, by treatment with trehalose, counteracts the effects of proteasomal blockade. Trehalose, a disaccharide present in many non-mammalian species, known to enhance autophagy, protects cells against various environmental stresses. Treatment with trehalose produced a dose and time-dependent increase in the number of autophagosomes and markers of autophagy in H1975 cells. Trehalose did not change the number of total nuclei, the number of dividing cells in the culture but it completely prevented the necrosis of H1975 induced by epoxomicin. In addition, the treatment with trehalose reversed the accumulation, induced by epoxomicin, of polyubiquitinated proteins, total and phosphorylated tau, p-Cdk5, and α -synuclein, as well as the α -synuclein intracellular aggregates. The effects of trehalose were not mediated through activation of free radical scavenging compounds, like GSH, or mitochondrial proteins, like Cyt1, but trehalose reduced the activation of ERK and chaperone HSP70 induced by epoxomicin. Inhibition of ERK phosphorylation prevented the epoxomicin-induced cell death. Inhibition of autophagy reverted the neuroprotective effects of trehalose in epoxomicin-induced cell death. These results suggest that trehalose is a powerful modifier of abnormal protein accumulation in neurodegenerative diseases.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Neurodegenerative diseases like Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD) and Huntington's disease (HD) are characterized by abnormal accumulation of different proteins in neurons and glia (Dohm et al., 2008; Eickholt et al., 2010; McMillan and Lavenex, 2010; Nakamura and Lipton, 2010). Amyloid β -peptide and tau accumulate in AD and other dementias, α -synuclein

in PD and huntingtin in HD. The mechanisms of accumulation of these abnormal proteins are unknown in most cases, though mutation, overproduction, abnormal processing and abnormal elimination have been proposed.

The processing of abnormal proteins is performed through different complementary systems including the ubiquitin–proteasome system, the chaperone-mediated autophagy and the macroautophagy. Impairment of abnormal protein processing by interfering with proteasomal function produces accumulation of toxic proteins which may interfere with synaptic plasticity and neuronal function. The ubiquitin–proteasome system (UPS) is one of the most important cellular mechanisms, together with the autophagy–lysosomal pathway (ALP), for elimination of proteins (Korolchuk et al., 2009; Matsuda and Tanaka, 2010; Rubinstein, 2010; Yue et al., 2009). The role of the proteasome and autophagy in the clearance of abnormal proteins in neurodegenerative diseases has been demonstrated (Alvarez-Erviti et al., 2010; Dave

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; ALP, autophagy–lysosomal pathway; A β , 7-amino-4-methylcoumarin-6-yl- β -D-glucosaminide; Cdk5, cyclin-dependent kinase 5; GSK-3 β , glycogen synthase kinase 3 β ; GSH, glutathione; HD, Huntington's disease; HSP, heat shock protein; HD, Huntington's disease; LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3; p-Cdk5, parkin null mice; PD, Parkinson's disease; pCNA, polyubiquitin–proteasome-like; UPS, ubiquitin–proteasome system.

* Corresponding author. Tel.: +34 91 2269160; fax: +34 91 2269016.

E-mail address: mena.ana@iics.csic.es (M.A. Mena).

0046-0146/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neuint.2011.01.008

COMUNICACIONES A CONGRESOS:

→ Autores: Rodríguez-Navarro, J.A; Perucho J; Solano, R.M; Casarejos, M.J; Rodal, I.; Gómez, A; Serrano M; Ampuero I; Martínez A; Furio V; García de Yébenes, J and Mena, M.A.

Título: Cerebral and systemic amyloidosis in parkin null mice overexpressing human mutated tau.

Tipo de participación: poster

Congreso: 6th FENS forum.

Publicación: Eur. J. Neurosci. 217.24

Lugar celebración: Ginebra (Suiza)

Fecha: 2008

→ Autores: Rodríguez-Navarro, J.A; Perucho J; Rodríguez-Alonso R; Solano, R.M; Casarejos, M.J; Rodal, I.; Gómez, A ; Serrano M; Ampuero I; Martínez A; Furio V; García de Yébenes, J and Mena, M.A.

Título: Parkin deletion causes amyloidosis in mice overexpressing human mutated tau.

Tipo de participación: poster

Congreso: Congreso de la Sociedad Internacional de Neurociencia

Publicación: J. Mol. Neurosci.

Lugar celebración: Washington (USA)

Fecha: Noviembre 2008

→ Autores: Rubio I; Rodríguez-Navarro JA; Perucho J; Ruiz C; Casarejos MJ; RM Solano; A Gómez; I Rodal; Lucas JJ; MA Mena and J G Yébenes.

Título: La anulación parcial de parkina agrava la acinesia de ratones hungtintonianos.

Tipo de participación: poster

Congreso: Congreso de la Sociedad Española de neurología (SEN).

Publicación: Rev Neurología Abril 2008

Lugar celebración: Gran Canaria, (España)

Fecha: 2008

→ Autores: Rosa M. Solano, Maria J. Casarejos, José A. Rodriguez-Navarro, Ana Gómez, Juan Perucho, Jose G. Castaño, Justo García de Yébenes and Maria A. Mena.

Título: La ausencia de parkina aumenta la resistencia de las neuronas mesencefálicas a la inhibición parcial del proteasoma. Papel del glutathion y la autofagia.

Tipo de participación: poster

Congreso: XII Congreso de la Sociedad Española de Neurociencias (SENC)

Publicación:

Lugar celebración: Tarragona (España)

Fecha: Septiembre 2009

→ Autores: Juan Perucho, Maria José Casarejos, Isabel Rubio, José Antonio Rodríguez-Navarro, Ana Gómez, Izaskun Rodal, Diego Parise, Pilar Arribas Pérez, Eva Carro, Rosa Maria Solano, Maria Ángeles Mena, Justo García de Yébenes

Título: La anestesia como factor modificador de la toxicidad por amiloide en un modelo de Alzheimer. Barcelona SEN

Tipo de participación: poster

Congreso: Congreso de la Sociedad Española de neurología (SEN)

Lugar celebración: Barcelona (España)

Fecha: Noviembre 2009

→ Autores: Rodríguez-Navarro, J.A; Perucho J; Rodríguez-Alonso R; Solano, R.M; Casarejos, M.J; Rodal, I.; Gómez, A ; Serrano M; Ampuero I; Martínez A; Furio V; García de Yébenes, J and Mena, M.A.

Título: Parkin deletion causes amyloidosis in mice overexpressing human mutated tau.

Tipo de participación: poster

Congreso: Mov. Disorders

Publicación:

Lugar celebración: Paris (Francia)

Fecha: Junio 2009

→ Autores: J. Perucho, M.J. Casarejos, J.A. Rodríguez-Navarro, I. Rubio, I. Ampuero, A. Gomez, I. Rodal, RM. Solano, L. Rodriguez, E. Carro, J. Garcia de Yebenes, M.A. Mena.

Título: Effect of hemizygotic parkin suppression in aPPswe mutant mice.

Tipo de participación: poster

Congreso: Mov. Disorders

Publicación:

Lugar celebración: Paris (Francia)

Fecha: Junio 2009

→ Autores: Jose A. Rodríguez-Navarro; María J. Casarejos; Laura Rodríguez; Rosa M. Solano; Ana Gómez; Juan Perucho; Justo García de Yébenes; and Maria A. Mena.

Título: Behavioral, Biochemical and Anatomical benefits of trehalose in parkin deleted/tau overexpressing mice.

Participación: Comunicación

Congreso: EMBO Workshop "Proteolysis and Neurodegeneration"

Lugar celebración: Madrid

Fecha: Mayo 2010.

→ Autores: María J. Casarejos; Rosa M. Solano; Ana Gómez; Juan Perucho; Jose A. Rodríguez-Navarro; Justo García de Yébenes and Maria A. Mena.

Título: Trehalose induces autophagy and protects from epoxomicin-induced neurotoxic effects in human neuroblastoma cells

Participación: Póster

Congreso: Comunicación al EMBO Workshop "Proteolysis and Neurodegeneration"

Lugar celebración: Madrid

Fecha: Mayo 2010

→ Autores: Jose A. Rodríguez-Navarro; María J. Casarejos; Laura Rodríguez; Ana Gómez; Rosa M. Solano; Juan Perucho; Ana M. Cuervo; Justo García de Yébenes and Maria A. Mena.

Título: Trehalose ameliorates dopaminergic and tau pathology in parkin deleted / tau overexpressing mice through autophagy activation

Participación: Póster

Congreso: "14th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders"

Lugar celebración: Buenos Aires, Argentina

Fecha: Junio 2010

→ Autores: Rosa M Solano, María J Casarejos, Juan Perucho, Justo G de Yébenes and María A Mena.

Título: Effects of amyloid (1-42) beta~peptide on cortical cultures from parkin null mice

Participación: Póster

Congreso: "14th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders"

Lugar celebración: Buenos Aires, Argentina

Fecha: Junio 2010

→ Autores: María J. Casarejos; Rosa M. Solano; Ana Gómez; Juan Perucho; Jose A. Rodríguez-Navarro; Justo García de Yébenes and Maria A. Mena.

Título: Trehalose induces autophagy and protects from epoxomicin-induced neurotoxic effects in human neuroblastoma cells

Participación: Comunicación

Congreso: "14th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders"

Lugar celebración: Buenos Aires, Argentina

Fecha: Junio 2010

→ Autores: Jose A. Rodríguez-Navarro; María J. Casarejos; Laura Rodríguez; Rosa M. Solano; Ana Gómez; Juan Perucho; Justo García de Yébenes; and Maria A. Mena
Título: Behavioral, Biochemical and Anatomical benefits of trehalose in parkin deleted/tau overexpressing mice

Participación: Comunicación

Congreso: 4 Foro CIBERNED

Lugar celebración: Santander.

Fecha: Diciembre 2010

→ Autores: María J. Casarejos; Rosa M. Solano; Ana Gómez; Juan Perucho; Jose A. Rodríguez-Navarro; Justo García de Yébenes and Maria A. Mena.

Título: Trehalose induces autophagy and protects from epoxomicin-induced neurotoxic effects in human neuroblastoma cells

Participación: Comunicacion.

Congreso: 4 Foro CIBERNED

Lugar celebración: Santander.

Fecha: Diciembre 2010

